

Untersuchungen zur Struktur
und Funktion des
aktinbindenden Proteins Severin
von
Dictyostelium Discoideum

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Elisabeth André

aus Mayen

Juni 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. David
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. MacWilliams
- Sondergutachter : Prof. Dr. G. Gerisch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Januar 1989

Meinen Eltern

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1984 bis Dezember 1987 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Gerisch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Gerisch danke ich für die Themenstellung, die Überlassung eines Arbeitsplatzes und sein Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Noegel und Herrn Dr. M. Schleicher für wertvolle Hilfestellungen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. C. David danke ich für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät und für sein Interesse an der Arbeit.

Danken möchte ich Frau Dr. E. Wallraff, die mir die Mutante zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. J. Stadler danke ich für die Markierung der monoklonalen Antikörper mit ¹²⁵J.

Bei Herrn Dr. J. Segall bedanke ich mich herzlich für die Durchführung der Chemotaxis- und Motilitätsmessungen, sowie die Hilfe bei den Lichtstreuungsmessungen.

Besonders herzlich danke ich Frau B. Wetterauer, die durch Freundschaft und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Zellbiologie, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für ihre Hilfe, ohne die die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

André, E., Lottspeich, F., Schleicher, M., Noegel, A. (1988): Severin, Gelsolin and Villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. J. Biol. Chem. 263: 722-727.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1.	Zellkultur von <i>D. discoideum</i>	8
2.2.	Filterentwicklung von <i>D. discoideum</i>	8
2.3.	Viskositätstest	9
2.4.	Reinigung von Severin	9
2.5.	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	11
2.5.1.	Immunisierung der Mäuse	11
2.5.2.	Fusion	11
2.5.3.	Klonierung	13
2.5.4.	Einfrieren von Hybridomazellen	14
2.5.5.	Benennung der Antikörper	14
2.5.6.	Reinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen	15
2.6.	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	15
2.7.	Radioimmunoassay	16
2.8.	Immunoblot	17
2.9.	Kompetierungstest	18
2.10.	Inhibitionstest	18
2.11.	"Screening" einer gt 11 cDNA-Bank	19
2.11.1	"Screening" mit monoklonalen Antikörpern	19
2.11.2.	"Screening" mit spezifischer DNA	20
2.12.	Vermehrung und Aufreinigung von rekombinanten gt 11 Phagen	21
2.13.	Subklonierung der cDNA-Fragmente in die Plasmide pUC 19 und und pGem 4	22
2.14.	Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.14.1.	Plasmidpräparation nach Holmes und Quigley	23
2.14.2.	Plasmidpräparation nach Birnboim und Dolby	24



2.14.3.	"Cleared Lysate" Plasmidisolierung	25
2.15.	Isolierung von genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i> Zellkernen	26
2.16.	RNA-Isolierung	27
2.17.	Southern Transfer und Hybridisierung	27
2.18.	Northern-Blot-Analyse	28
2.18.1.	Formaldehyd RNA Gel	28
2.18.2.	Transfer	29
2.18.3.	Hybridisierung	29
2.19.	Sequenzanalyse	29
2.19.1.	Vorbereitung des Templates	30
2.19.2.	Anhybridisieren des Primers und Polymerase Reaktion	30
2.19.3.	Gelelektrophorese	32
2.19.4.	Aufreinigung von synthetischen Oligonukleotiden	33
2.20.	Nicktranslation	33
2.21.	Kompetente Zellen	34
2.22.	Transformation	35
2.23.	Agarosegele	35
2.24.	Elektroelution aus Agarosegelen	35
2.25.	Zellbiologische Methoden	36
2.25.1.	Lichtstreuungsmessung	36
2.25.2.	Chemotaxis	37
2.25.3.	Motilität	37
2.26.	Herstellung einer genomischen Bank	38
2.27.	Andere Methoden	38
2.28.	Sonstiges	38
2.29.	Chemikalien	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1.	Reinigung von Severin	40
3.2.	Monoklonale Antikörper	43
3.3.	Kompetition zwischen den monoklonalen Antikörpern	44

3.4.	Inhibition der Severinaktivität durch mAK 102-200-1	45
3.5.	Isolierung von Severin-spezifischen cDNA-Klonen	48
3.6.	Charakterisierung der gt11 Klone	49
3.7.	Immunreaktion der Fusionsproteine mit den monoklonalen Antikörpern	51
3.8.	Genomische Organisation von Severin	52
3.9.	Größe der mRNA und Transkription des Severin-Gens während der <i>Dictyostelium</i> Entwicklung	54
3.10.	Sequenzanalyse der cDNA-Klone und ihre Identifizierung als Severin-spezifische Klone	55
3.11.	Übereinstimmung zwischen der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz und der Sequenz eines Severin-peptids	61
3.12.	Sekundärstrukturvorhersage nach Chou und Fasman	61
3.13.	Bestimmung des hydrophilen Charakters von Severin	64
3.14.	Homologien in der Aminosäuresequenz von Severin zu Sequenzen von funktionsähnlichen Proteinen anderer Organismen	65
3.15.	Charakterisierung der Severinmutante HG1132	66
3.15.1.	Immunologische Charakterisierung	67
3.15.2.	Biochemische Charakterisierung	69
3.15.3.	Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante	74
3.15.3.1	Untersuchung zum Restriktionspolymorphismus zwischen HG1132 und AX2	74
3.15.3.2.	Vergleich von Severin-Gen-Transkripten aus AX2 und HG1132	75
3.15.3.3.	Untersuchung zur Entwicklungsregulation des Severin-Gen-Transkripts in der Mutante	76
3.15.4.	Zellbiologische Untersuchung der Mutante HG1132	78
3.15.4.1.	Lichtstreuungsmessungen	78
3.15.4.2.	Chemotaxis	80
3.15.4.3.	Quantitative Analyse von Motilität und Chemotaxis	81

4.	DISKUSSION	84
4.1.	Severin zeigt Sequenzhomologien zu anderen F-Aktin-fragmentierenden Proteinen	84
4.1.1.	Sequenzhomologie zwischen Severin und Gelsolin	84
4.1.2.	Sequenzvergleich zwischen Severin und Villin	87
4.1.3.	Sequenzvergleich zwischen Severin und Fragmin	89
4.1.4.	Sequenzvergleich zwischen Severin und Aktin	91
4.2.	Bei der Mutante wurden keine zellbiologischen Defekte gefunden	94
4.3.	Expression des Severin-Gens : Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante	95
5.	ZUSAMMENFASSUNG	99
6.	LITERATURVERZEICHNIS	101

Abkürzungen

A	Adenin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ci	Curie
cpm	Zählpulse pro Minute
DEAE	Diethylaminoethyl
DEP	Diethylpyrocarbonat
DF	Durchfluß; Material das nicht an die Säule gebunden hat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP/ddNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat/di-Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
FA	Formamid
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
GAR	Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper
HA	Hydroxyapatit
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonyl-säure
IgG	Immunglobulin G
IPITG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
mAK	monoklonaler Antikörper
MES	4-Morpholin-Ethansulfonsäure
MNNG	1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphozellulose
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units
RIA	Radioimmunoassay
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid

RNA/mRNA	Ribonukleinsäure/Botenribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAM	Schaf-anti-Maus-Antikörper
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	s.S.20
T	Thymidin
TB	s.S.27
TBE	s.S.32
TP	s.S.27
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

Für Aminosäuren verwendete Abkürzungen:

Ala, A	Alanin
Cys, C	Cystein
Asp, D	Asparaginsäure
Glu, E	Glutaminsäure
Phe, F	Phenylalanin
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Lys, K	Lysin
Leu, L	Leucin
Met, M	Methionin
Asn, N	Asparagin
Pro, P	Prolin
Gln, Q	Glutamin
Arg, R	Arginin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Val, V	Valin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin

1. Einleitung

In eukaryontischen Zellen nimmt Aktin mit bis zu 20% des Gesamtproteingehalts einen hohen Anteil ein (Korn et al., 1987). Aktin ist nicht nur eines der häufigsten, sondern auch eines der am stärksten konservierten Proteine. Etwa die Hälfte des Aktins liegt in polymerisierter Form vor. Bei der Polymerisationsreaktion lagern sich die globulären Untereinheiten (G-Aktin, 42 kD) zu bis zu mehreren μm langen Aktinfilamenten zusammen. Der Ablauf der Aktinpolymerisation kann in vier aufeinanderfolgende, reversible Schritte unterteilt werden (Pollard and Cooper, 1986). Zunächst werden die Aktinmonomere aktiviert. Hierunter versteht man die durch die Bindung von Mg^{2+} -Ionen hervorgerufene Konformationsänderung von G-Aktin. Mg^{2+} -Aktin bildet etwa zehnmal schneller Nuklei als nicht aktiviertes Aktin. Als Nukleus für die Aktinpolymerisation wird das kleinste Aktinoligomer definiert, das mit höherer Wahrscheinlichkeit zu Aktinfilamenten polymerisiert als in Monomere zerfällt. Der Bindung der Untereinheiten liegen hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zu Grunde. Das Oligomer wird durch Anlagerung von G-Aktin an beiden Enden verlängert, jedoch ist ein Ende als schnell wachsendes Ende favorisiert. Während des letzten Schrittes der Aktinpolymerisation lagern sich Aktinfilamente aneinander. Sowohl Aktinmonomere als auch Aktinfilamente binden Adeninnukleotide. Die Hydrolyse des gebundenen ATP findet als Folge der Aktinpolymerisation statt. Im Elektronenmikroskop erscheint das Aktinfilament als doppelsträngige, rechtsgängige Helix (Mornet und Ue, 1984), deren Stränge sich alle 36 nm kreuzen. Detaillierte Beugungsstudien weisen jedoch darauf hin, daß das Aktinfilament eine einsträngige, linksgängige Helix darstellt (Korn et al., 1987). Dies ist zur Zeit das bevorzugte Modell für die Struktur des Aktinfilaments.

In Nichtmuskelzellen übernehmen Aktinfilamente vielfältige Aufgaben. So spielen sie beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der amöboiden Bewegung, bei der Fibroblastenbewegung (Wehland et al., 1977; Taylor und Condeelis, 1979), bei

Zytokinese (Sanger und Sanger, 1980), Phagozytose (Stossel und Hartwig, 1976), der Retraktion der Blutplättchen und der akrosomalen Reaktion der Spermien (Tilney et al, 1973). Außerdem übernehmen Aktinfilamente strukturelle Funktionen in der Zelle. Durch Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes gewährleisten sie die strukturelle Organisation und die viskoelastischen Eigenschaften des Zytoplasmas (Stossel, 1984; Pollard, 1986). Voraussetzung für viele dieser erwähnten Funktionsweisen von Aktin ist dessen Interaktion mit den sogenannten aktinbindenden Proteinen. Man unterscheidet zwischen G-Aktin- und F-Aktin-bindenden Proteinen. Die typischen G-Aktin-bindenden Proteine bilden einen Komplex mit Aktin, der nicht polymerisiert. Dadurch wird die Konzentration an freien Aktinmonomeren reduziert. Zu dieser Gruppe von aktinbindenden Proteinen gehören die Profiline, lösliche Proteine mit einer Molmasse von 13 kD bis 15 kD, die sowohl aus niederen Eukaryonten (*Physarum*) als auch aus Vertebratenzellen isoliert werden können. DNase-I, ein sekretorisches Protein der Bauchspeicheldrüse mit einer Molmasse von 33 kD, und Vitamin D-Bindeprotein, das aus Serum isoliert werden kann, sind ebenfalls Vertreter dieser Klasse von aktinbindenden Proteinen (Pollard und Cooper, 1986).

Die F-Aktin-bindenden Proteine teilt man nach Art ihrer Interaktion mit Aktinfilamenten in drei Hauptgruppen ein (Pollard und Cooper, 1986; Stossel et al., 1985):

- a) "crosslinking proteins"
- b) "bundling proteins"
- c) "capping/fragmenting proteins"

Die "crosslinking proteins", die in den meisten Fällen als Dimere vorliegen, sind aktinbindende Proteine, die zwei Bindungsstellen für Aktinfilamente besitzen. Dadurch sind sie in der Lage, durch seitliche Bindung an Aktinfilamente, diese miteinander zu verknüpfen und ein dreidimensionales Netzwerk zu bilden, das der Aktinlösung eine gelartige Konsistenz verleiht. Aufgrund dieser Wirkungsweise weist man den "crosslinking proteins" einen bedeutenden Einfluß

auf die mechanischen Eigenschaften des Zytoplasmas zu.

Die "bundling proteins" binden ebenfalls entlang den Seiten von Aktinfilamenten. Durch Strukturuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die "bundling proteins" gebündelt und parallel zu den Aktinfilamenten liegen. Wahrscheinlich haben diese Proteine zwei verschiedene Bindungsstellen für F-Aktin, womit die regelmäßige Anordnung der Filamente zu erklären wäre (Pollard und Cooper, 1986).

Bei den "capping proteins" handelt es sich in der Regel um Heterodimere; die Molmassen der Untereinheiten betragen 30 bis 35 kD. Die Wirkung der "capping proteins" ist Calcium-unabhängig. Die meisten bisher beschriebenen Vertreter dieser Gruppe binden an das schnell wachsende Ende der Aktinfilamente und verhindern die Anlagerung von Aktinmonomeren an dieses Ende.

Eine Ausnahme ist Beta-Aktinin, das aus Skelettmuskel isoliert werden kann (Maruyama et al., 1977). Es besteht aus zwei Untereinheiten mit den Molmassen 37 kD und 35 kD, und bindet nicht an das schnell wachsende Ende des Aktinfilaments, sondern an das sogenannte "pointed end".

Außerdem binden die "capping proteins" auch an Aktinmonomere, wodurch sie deren spontane Polymerisation beschleunigen. Das führt zu einer großen Anzahl kürzerer Aktinfilamente und einer Viskositätsabnahme der Aktinlösung (Pollard und Cooper, 1986).

Die "fragmenting" oder auch "severing proteins" verkürzen die Aktinfilamente, indem sie seitlich an ein Aktinfilament binden und zwischen zwei Aktinuntereinheiten eingelagert werden. Dadurch entstehen zwei neue Filamentenden, von denen das schnell wachsende Ende durch das gebundene Protein blockiert ist. Die Wirkungsweise der "fragmenting proteins" erfolgt sehr schnell; sie ist Calcium-abhängig (Stossel et al., 1985; Pollard und Cooper, 1986).

Aufgrund ihres Molekulargewichtes unterscheidet man drei Klassen von "fragmenting proteins": a) Villin/Gelsolin, 90 bzw. 95 kD (Bretscher und Weber, 1980; Glenney et al., 1980; Mooseker et al., 1980/ Yin und Stossel, 1979; Yin et al., 1981), aus Vertebratenzellen isoliert; b) Severin/Fragmin, 40 bzw. 42 kD, (Brown et

al, 1982; Yamamoto et al, 1982; Giffard et al., 1984/ Hasegawa et al., 1980; Hinssen, 1981), aus niederen Eukaryontenzellen isoliert; c) niedermolekulare "fragmenting proteins", 15 bis 20 kD, aus Vertebraten (Aktin depolymerisierender Faktor, 19 kD; Ohta et al., 1984), Echinodermaten (Depactin, 20 kD) und Protozoen (Actophorin, 15 kD).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht das aus *Dictyostelium discoideum* isolierte, Aktinfilamente fragmentierende Protein Severin (Brown et al., 1982). *D.discoideum* ist ein eukaryontischer Mikroorganismus, der der Abteilung der Myxomyceten und der Unterklasse Dictyostelidae zugeordnet werden kann (Raper, 1973). Während der Wachstumsphase existieren die Zellen als einzelne Amöben, die sich durch eine starke Motilität auszeichnen. Als Reizantwort auf chemotaktische Faktoren sind die Amöben in der Lage sowohl ihre Gestalt als auch die Fortbewegungsrichtung zu ändern. Den Amöben fehlen Strukturen wie zum Beispiel Stressfasern, die die Struktur des Zytoskeletts stabilisieren. Durch Hungern wird bei den *Dictyostelium*-Zellen eine Entwicklung ausgelöst, die zur Zellaggregation führt. Aggregierende Zellen zeigen eine starke chemotaktische Antwort auf cAMP. Da sich die Zellen innerhalb kurzer Zeit auf eine cAMP-Quelle hinbewegen, muß die chemotaktische Antwort mit einer schnellen Reorganisation des kontraktiven Systems der Zelle einhergehen. An diesem Prozeß sind möglicherweise aktinbindende Proteine beteiligt, indem sie die Anordnung der verschiedenen Komponenten des kontraktiven Systems kontrollieren.

Aus *D.discoideum* konnten bisher Vertreter jeder der oben erwähnten Gruppen von aktinbindenden Proteinen isoliert werden:

Den "crosslinking-proteins" werden die aus *D.discoideum* isolierten Proteine α -Aktinin (Condeelis und Vahey, 1982; Fechheimer et al., 1982), "120 kD" (Condeelis et al., 1982), "240 kD" Hock und Condeelis, 1987) und Fodrin (Bennett und Condeelis, 1985) zugeordnet. Zu den "bundling proteins" zählt man ein 50kD (Hock und Condeelis, 1985) und ein 30 kD Protein (Fechheimer, 1987). Severin (Brown et al., 1982) und "cap 32/34" (Schleicher et al., 1984) sind Vertreter der Gruppe der

"capping/fragmenting proteins".

Severin ist ein zytoplasmatisches Protein mit der Molmasse 40kD. Severin scheint nicht in der Aktinmatrix des Zellcortex lokalisiert zu sein (Giffard et al., 1983). Die Interaktion von Severin mit F-Aktin ist Calcium-abhängig. Hinweise darauf, daß das Severinmolekül in Anwesenheit von Calcium ($1 - 5 \times 10^{-6}$ M) seine Konformation aufgrund der Bindung von Ca^{2+} ändert, ergaben sich aus kinetischen Messungen der Emissions-Anisotropie von mit IAENS (5-(iodoacetamidoethyl)aminonaphtalen-1-Sulfonsäure) markiertem Severin, mit und ohne Calcium (Yamamoto et al., 1982): Nach Bindung von Calcium nimmt die Rotationsbeweglichkeit ab. Nach Konformationsänderung bindet Severin an das schnell wachsende Ende des Aktinfilaments (Yamamoto et al., 1982). Der Viskositätstest ergab, daß die Aktinfilamente bereits 30 Sek. nach Severinzugabe vollständig fragmentiert sind (Yamamoto et al., 1982). Diese schnelle Wirkung von Severin wird damit erklärt, daß Severinmoleküle an räumlich voneinander getrennten Stellen des Aktinfilaments binden. An F-Aktin gebundenes Severin kann durch Erniedrigung der Calciumkonzentration unter 1×10^{-7} M durch Zugabe von EGTA nicht freigesetzt werden. Dies deutet darauf hin, daß für die Dissoziation des gebundenen Severinmoleküls ein anderes akzessorisches Protein benötigt wird (Giffard et al., 1984). Nach Zugabe des Severin-Aktin-Komplexes zu einer F-Aktinlösung ist keine Viskositätserniedrigung messbar (Giffard et al., 1984).

Die Bindung von Severin wird auch durch verschiedene Aktin bindende Faktoren wie zum Beispiel DNase-I, Cytochalasin B, Phalloidin und Tropomyosin nicht beeinflusst; jedoch stabilisiert die Bindung von Myosin-S1-Fragment, das auch an das "schnell wachsende" Ende von Aktin bindet, die Aktinfilamente (Giffard et al., 1984).

Die physiologische Bedeutung von Severin ist unbekannt, jedoch finden in der Zelle Prozesse statt, bei denen eine Beteiligung von Severin denkbar wäre. Aktinfilamente sind sehr stabile Strukturen, die bei physiologischen Salzkonzentrationen nur einen begrenzten Austausch von Aktinuntereinheiten aufweisen.

Man kann sich vorstellen, daß Severin bei dem Abbau von Aktinfilamenten zu Aktinolligomeren in vivo eine Rolle spielt. Für viele Vorgänge wie Zytokinese, Zellbewegung, Endozytose ist ein Auf- und Abbau von Aktinfilamenten notwendig, der durch das Zusammenspiel von Severin mit anderen aktinbindenden Proteinen reguliert werden könnte.

Meine Aufgabe war es, Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Severinmoleküls durchzuführen. Ein Ziel war die Klonierung und Sequenzierung des Severin-Strukturgens. Die von der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit den Sequenzen der funktionsverwandten Proteine Gelsolin (Kwiatkowski et al., 1986), Villin (Matsudeira et al., 1985) und Fragmin (Ampe und Vandekerckhove, 1987) verglichen. Durch diesen Vergleich sollten Hinweise auf die Funktion bestimmter Domänen des Proteins erlangt werden. Die Frage nach der Funktion bestimmter Domänen des Severinmoleküls wurde in einem Inhibitionstest untersucht, in dem die Auswirkungen der Bindung von monoklonalen Antikörpern, die gegen unterschiedliche Epitope des Severinmoleküls gerichtet sind, auf die Fragmentierung von Aktinfilamenten im Viskositätstest (MacLean-Fletcher und Pollard, 1980) getestet wurde.

Die Anwendung der von Chou und Fasman (1982) entwickelten Methode zur Sekundärstrukturvorhersage aufgrund der Aminosäuresequenz erlaubte es, Aussagen über die Sekundärstruktur des Severinmoleküls zu machen.

Ein Weg zur Aufklärung der physiologischen Rolle von Severin besteht darin, eine Mutante von *D.discoideum* zu isolieren, die das Protein nicht exprimiert. In der Hoffnung, einen physiologischen Defekt bei der Mutante aufzudecken, wurden zellbiologische Experimente durchgeführt, die Aufschluß über Wachstums-, Entwicklungs- und Bewegungsfähigkeit der Mutantenzellen geben sollten.

Mir wurde die Mutante HG1132 zur Verfügung gestellt, die durch Mutagenisierung von Zellen des AX2-Stammes mit N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) erzeugt wurde. Die Mutante wurde mit Hilfe der "colony-blot-Technik" und anschließender Inkubation mit einem anti-Severin Antikörper gefunden (Wallraff

et al., 1986). Um nachzuweisen, daß es sich wirklich um eine Severin-freie Mutante handelt, habe ich monoklonale und polyklonale Antikörper gegen Severin hergestellt und im Immunoblot mit Zellhomogenat von HG1132 Zellen getestet. Außerdem wurden Mutantenzellen biochemisch charakterisiert, indem das für die Reinigung von Severin aus Wildtypzellen ausgearbeitete Schema angewendet wurde und die viskositätsniedrigende Aktivität der anfallenden Proteinfraktionen bestimmt wurde. Mit einem der für Severin kodierenden DNA-Fragmente wurde die Mutante auf einen Defekt auf DNA- und RNA-Ebene hin untersucht. Mit der so charakterisierten Mutante wurden im Rahmen der zellbiologischen Experimente Lichtstreuungsversuche, in denen die durch Veränderung der Zellform hervorgerufenen Lichtstreuungsänderungen einer Zelle gemessen werden können (Gerisch und Hess, 1974), sowie Chemotaxis- und Motilitätsmessungen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur von *D.discoideum*

D.discoideum Stamm AX2 wurde axenisch (Ashworth und Watts, 1970) bei 23°C in Schüttelkultur (150 rpm) oder im großen Maßstab im Fermenter (10 l) angezogen (Claviez et al., 1982). Entwicklung zur Aggregationskompetenz wurde erreicht indem die Zellen, nachdem sie eine Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml erreicht hatten, geerntet wurden und anschließend bei einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer (17 mM, pH 6,0) sechs bis acht Stunden unter Gabe von Pulsen von 20 nM cAMP alle 6-7 Minuten weitergeschüttelt wurden (Stadler et al., 1982). Geerntet wurden die Zellen durch Abzentrifugation der Zellkultur im Ausschwingrotor (1500g, 5 Min.). Große Volumina wurden in einer Durchlaufzentrifuge (2000g) abzentrifugiert. Gewaschen wurde dreimal mit dem halben Ausgangsvolumen an eiskaltem Phosphatpuffer.

2.2. Filterentwicklung von *D.discoideum*

Axenisch gewachsene Amöben von *D.discoideum* wurden nach dreimaligem Waschen in eiskaltem Phosphatpuffer (17 mM, pH 6,0) auf Millipore Membranfilter (HA, 0,45 µm Porengröße; 47 mm Durchmesser) gegeben (Newell et al., 1969). Die Filter wurden auf zwei Lagen Whatman Filterpapier (3MM) gelegt, das zuvor mit LPS (1,5 g KCl, 0,5 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,5 g Dihydrostreptomycinsulfat, 5,45 g KH_2PO_4 pro Liter) getränkt worden war. Pro Filter wurden 1×10^8 *D.discoideum* Zellen in 0,5 ml aufgetragen. Der Versuch wurde in geschlossenen Petrischalen bei 21°C und Licht durchgeführt. Am Deckel der Petrischale wurde ein mit Puffer getränkter Filter befestigt (Krefft et al., 1984). Zellen verschiedener Entwicklungsstadien wurden geerntet.

2.3. Viskositätstest

Die Beeinflussung der Viskosität einer F-Aktinlösung durch aktinbindende Proteine wurde in einem einfachen in-vitro Test, dem sogenannten "falling-ball-viscometry-assay" (MacLean Fletcher und Pollard, 1980) nachgewiesen. Das Gesamtvolumen des Versuchsansatzes betrug 160 µl. Zu 50 µl einer G-Aktinlösung (50 mg/ml G-Puffer, G-Puffer: 2 mM Tris-HCl, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, 0,02% NaN₃, pH 7,5) wurde eine bestimmte Menge der zu testenden Proteinlösung gegeben. Mit aqua dest. wurde das Volumen auf 144 µl gebracht. Dann wurden 16 µl des 10fach konzentrierten Polymerisationspuffers (100 mM Imidazol, 20 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ oder 10 mM EGTA, 10 mM ATP, pH 7,5) hinzugefügt. In einer unten verschlossenen 100 µl Mikropipette (Becton, Dickinson & Co., Parsippany, NJ) erfolgte die Inkubation (10 Min, 23°C).

Als Maß für die Viskosität der Lösung diente die Zeit, die eine kleine Stahlkugel (Microball Co., Peterborough, NH) benötigt eine definierte Strecke in dieser Mikropipette zurückzulegen. Dieser Wert wurde auf die Zeit bezogen, die die Stahlkugel benötigt, die gleiche Strecke in einer Mikropipette zurückzulegen, die, bei ansonsten gleichem Ansatz, anstelle der zu testenden Proteinlösung, Puffer oder aqua dest. enthält (= 100 % relative Viskosität).

2.4. Reinigung von Severin

Zur Reinigung von Severin wurde eine Modifikation der von Yamamoto et al. (1982) beschriebenen Methode angewendet.

Nach der Abzentrifugation (s.o.) wurden die *D.discoideum* Zellen mit dem doppelten Volumen an eiskaltem Homogenisationspuffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, 0,2 mM ATP, 0,5 mM PMSF, 5 mM Benzamidin, 0,02% NaN₃, 30% Saccharose, pH 7,5) versetzt und in einer Parr-Bombe (450psi, 5Min) aufgeschlossen. Anschließend wurde im GSA-Rotor abzentrifugiert (10.000g, 4°C, 10Min). Im Sediment

befinden sich Membranen und Zellkerne. Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert (TFT45, 100.000g, 3Std). Im Sediment befindet sich unter anderem Myosin, während die zytoplasmatischen Proteine, zu denen auch Severin gehört, im Überstand enthalten sind. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und auf eine DEAE-Säule (DE52 Zellulose, Whatman) gegeben, die zuvor in DEAE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 0,02% Na₃N, 1 mM Benzamidin, 0,5 mM PMSF, pH 7,5) äquilibriert worden war. Severin bindet bei den gewählten Bedingungen nicht an das Säulenmaterial, und seine viskositätserniedrigende Aktivität konnte bereits nach diesem ersten Reinigungsschritt im Säulendurchfluß mit Hilfe des Viskometrie-Tests nachgewiesen werden. Zur weiteren Aufreinigung von Severin wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Severin fällt bei einer 60 - 80%igen Ammoniumsulfatsättigung. Das nach Abzentrifugation (SS34, 15.000 rpm, 15 Min.) erhaltene Präzipitat wurde in einem geringen Volumen TEDA-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,02% Na₃N, pH 7,5) aufgenommen und gut gegen KP-Puffer (10 mM KPO₄, 0,2 mM DTT, pH 6,7) dialysiert. Die Probe wurde dann auf eine Hydroxyapatit-Säule (BioRad) gegeben, die in KP-Puffer äquilibriert worden war. Die Elution der Säule erfolgte nach Waschen mit dem doppelten Säulenvolumen an KP-Puffer durch Anlegen eines KCl-Gradienten (0 - 0,4 M KCl). Fraktionen, in denen Severin-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden gesammelt und gegen MEDAB-Puffer (10 mM MES, 1 mM EGTA, 0,1 mM DTT, 0,02% Na₃N, 1 mM Benzamidin, pH 6,8) dialysiert. Die Probe wurde dann auf eine mit MEDAB-Puffer äquilibrierte Phosphozellulose-Säule (P11, Whatman) aufgetragen. Eluiert wurde mit einem NaCl-Gradienten (0 - 0,2 M NaCl). Säulenfraktionen, die laut Viskositätstest Severin enthielten, wurden vereinigt und in Ultrafiltrationshülsen (Schleicher + Schüll, 25 kD Ausschußvolumen) ankonzentriert und auf eine Sephacryl-Gelfiltrationssäule (S 300, Pharmacia) gegeben. Die Fraktionen mit viskositätserniedrigender Aktivität enthielten das gereinigte Severin. Nach Anfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blue waren außer der 40 kD

Bande des Severins keine weiteren Banden sichtbar.

2.5. Herstellung von monoklonalen Antikörpern

2.5.1. Immunisierung der Mäuse

Zwei Balb/c Mäuse (w, 4 - 6 Wochen) wurden mit aktivem Severin immunisiert. Als Adjuvans diente bei einer Maus Freund's Adjuvans, während bei der zweiten Maus Aluminiumhydroxid verwendet wurde.

Immunisierungsvorschrift

Maus 1 (Fusion 101):

50 µg Severin + 100 µl Freund's Adjuvans komplett, i.p.

nach 25 Tagen: 40 µg Severin + 100 µl Freund's Adjuvans inkomplett, i.p.

Maus 2 (Fusion 102):

20 µg Severin + 50 µl Alugel S, i.p.

nach 11 Tagen: 20 µg Severin + 100 µl Pertussis Antigen, i.p.

nach 15 Tagen: 30 µg Severin + 50 µl Alugel S, i.p.

nach 25 Tagen: 50 µg Severin + 100 µl Alugel S, i.p.

2.5.2. Fusion

Milzzellen von immunisierten Mäusen werden mit Myelomzellen fusioniert, und die Hybridomazellen werden selektioniert (Köhler und Milstein, 1976). Milzzellen sind nicht in der Lage, in Gewebekulturmedium zu überleben. Die Myelomzellen der verwendeten Zelllinien besitzen keine Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HPRT) und sterben folglich in Kulturmedium, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin versetzt ist (HAT-Medium). Durch Aminopterin wird die Purin-Synthese

blockiert und der Syntheseweg über Hypoxanthin kann nicht benutzt werden, da das Enzym HPRT fehlt. Nur Hybride aus Milz- und Myelomzellen überleben in HAT Medium, da die Milzzellen das Enzym HPRT beisteuern.

Die Milz einer immunisierten Maus wurde unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und in jeweils 5ml kaltes RPMI 1640 Medium (Gibco) gegeben. Mit Pinzetten wurde die Milz auseinandergezupft, zerkleinert und anschließend durch eine sterile, mit Kunstfaserwolle gestopfte Spritze gedrückt. Die Lymphozyten wurden zweimal mit kaltem, serumfreien RPMI-Medium gewaschen. Zentrifugiert wurde in einer Hettich-Rotanta- Zentrifuge (1500 rpm, 4°C, 5 Min). Die Zellen wurden in 5ml RPMIoH (RPMI ohne Hepespuﬀer) aufgenommen und auf Eis gegeben. Pro Fusion benötigt man ca. 10^8 Lymphozyten. Zum Fusionieren wurden 10^8 Lymphozyten in 5 ml RPMIoH und 10^7 Myelomazellen (Stamm x63Ag8653 oder Stamm Sp2/01; von jeder Milz wurde eine Hälfte der Lymphozyten mit x63Ag8653, die andere Hälfte mit Sp2/01 fusioniert) in 5 ml RPMI zusammen gegeben. Der Ansatz wurde auf zwei sterile Falcon-Röhrchen verteilt. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 4°C, 5 Min.) wurden die Zellen noch einmal mit 5 ml RPMI gewaschen und auf Eis gestellt. Anschließend wurde ein Falcon-Röhrchen in ein Wasserbad (37°C) gestellt. Die Zellen wurden mit einer sterilen, mit Watte gestopften Pasteurpipette aufgewirbelt und 0,5 ml PEG-Lösung (1 g PEG 4000 (Polysciences) in 5 ml 0,9% iger NaCl-Lösung, sterilfiltriert) wurden hinzugefügt. Mit der Pasteurpipette wurde die Zellsuspension nochmals leicht gemischt. Anschließend wurde eine Minute lang im Wasserbad (37°C) leicht geschüttelt und dann kurz (1 Min.) bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb von fünf Minuten wurden tropfenweise und unter leichtem Schütteln des Röhrchens im Wasserbad 10 ml RPMIoH-Medium hinzugegeben. Erneut wurde abzentrifugiert und das Sediment in 96 ml Normalmedium ohne HAT (500 ml RPMI mit Hepes und Glutamin (Gibco) + 55 ml foetales Kälberserum (Gibco) + 5,5 ml 10^{-3} M Mercaptoäthanol + 5,5 ml Kanamycinlösung (4 mg/ml) + 5,5 ml 200 mM Glutamin (Flow)) aufgenommen. Die Suspension wurde auf

Costarplatten verteilt, in die zuvor Makrophagensuspension (Makrophagen einer Maus in 25 ml Normalmedium aufgenommen) gegeben worden war (0,5 ml pro Loch). Inkubiert wurden die Platten bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 95,5% Luftfeuchtigkeit. Nach 24 Stunden Inkubation wurde aus jedem Loch die Hälfte des Mediums mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, und pro Loch wurden 0,5 ml HAT-Medium hinzugegeben. (Zu 570 ml Normalmedium gibt man 5,5 ml 10^{-2} M Hypoxanthin, 5,5 ml einer 4×10^{-5} molaren Aminopterinlösung, 5,5 ml einer $1,6 \times 10^{-3}$ molaren Thymidinlösung, alle Lösungen sind steril filtriert.) An den beiden folgenden Tagen wurde genauso vorgegangen. Schließlich wurde das Medium pro Woche dreimal vollständig ausgetauscht. 15 Tage nach der Fusion wurde HAT-Medium durch HT-Medium (siehe HAT-Medium, jedoch ohne Aminopterinlösung) ersetzt, nach dem folgenden Mediumwechsel wurde HT-Medium durch Normalmedium ersetzt.

2.5.3. Klonierung

Die Überstände der Hybridomazellen wurden im Radioimmunoassay (RIA, s.2.7.) und Immunoblot (2.8.) getestet. Die Zellen, die ein positives Signal ergaben, wurden kloniert. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt. Durch Zugabe von Normalmedium wurde die Zellsuspension dermaßen verdünnt, daß bei ihrem Auftropfen aus einer ausgezogenen Pasteurpipette in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten, mit hoher Wahrscheinlichkeit pro Loch nur eine Hybridoma-Zelle gelangt. Mit dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob dies der Fall war. Zu Löchern, die nur eine Zelle enthielten, wurden zwei Tropfen Normalmedium und zwei bis drei Tropfen einer Makrophagensuspension gegeben (Makrophagensuspension: Makrophagen einer Maus in 25 ml Normalmedium aufgenommen). Nach ca. einer Woche war erkennbar, wo sich die klonierten Hybridomazellen vermehrt hatten. Nun wurden die Überstände erneut im Immunoblot getestet. Von Klonen, die ein positives Signal gaben, wurden mit der ausgezogenen Pasteurpipette zunächst Zellen auf Costarplatten und an-

schließlich in Gewebekulturflaschen (Falcon) übertragen (zuerst in kleine Flaschen: 25 cm² Grundfläche, 5 ml Normalmedium; dann in große Flaschen: 75 cm² Grundfläche, 20 ml Normalmedium).

2.5.4. Einfrieren von Hybridomazellen

Hochgewachsene Klone von vier großen Flaschen wurden abzentrifugiert (Hettich-Rotanta-Zentrifuge, 1000 rpm, 10 Min) und in eiskaltem Einfriermedium (70ml RPMI, 20 ml FCS, 12 ml DMSO, 1 ml 10⁻³M Mercaptoäthanol; steril filtriert) aufgenommen. Die Zelldichte sollte ca. 5x10⁶ Zellen/ml betragen. Pro Ampulle (1,5 ml Volumen, Nunc) wurde 1 ml Zellsuspension eingefüllt. Die Ampullen wurden in spezielle Einfrierköpfe für N₂ Dewargefäße gegeben, die so eingestellt wurden, daß die Temperatur pro Minute um 1°C abnahm.

Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml Falconröhrchen mit 20 ml Normalmedium transferiert. Das Medium wurde abzentrifugiert (1000 rpm, 10 Min.), die Zellen wurden in 10 ml Normalmedium aufgenommen und auf zwei kleine Kulturflaschen verteilt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (s.o.).

2.5.5. Benennung der Antikörper

Die erste Zahl steht für die Fusionsnummer. Die zweite Zahl kennzeichnet das Costarloch, aus dem der Hybridoma-Klon stammt. Die dritte Zahl ist die Nummer des Hybridoma-Klons auf der Mikrotiterplatte.

Bsp.: MAK 101-460-2 stammt aus der 101. Fusion, dem Costarloch Nr.460 und ist der 2.Klon, der aus dem Costarloch Nr.460 stammt.

2.5.6. Reinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen

Die Aufreinigung wurde bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Immunglobuline des Kulturüberstandes der Hybridomaklone wurden mit Ammoniumsulfat präzipitiert. Dazu wurden Kulturüberstand und gesättigte Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 45 : 55 miteinander gemischt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (GSA, 7000 rpm, 15 Min.) und in einem kleinen Volumen Natriumphosphatpuffer (0,14 M, pH 8,0) aufgenommen und gut gelöst. Anschließend wurde gegen Natriumphosphatpuffer (NaPP) über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse wurde erneut abzentrifugiert (SS 34, 7000- 8000 rpm, 15 Min.). Der Überstand wurde unter Rezirkulation auf eine in NaPP äquilibrierte Protein A-Sepharose-Säule (Pharmacia, 5 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Gewaschen wurde mit etwa 100 ml NaPP. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Essigsäure + 0,15 M NaCl. Die OD₂₈₀ der eluierten Fraktionen wurde bestimmt und IgG enthaltende Fraktionen wurden mit 1 M NaOH neutralisiert und anschließend gegen PBS (0,1 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,2) dialysiert.

Aus 2 l Kulturüberstand gewinnt man etwa 5 mg IgG.

2.6. Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Es wurden zwei Kaninchen und zwei Meerschweinchen mit gereinigtem Severin immunisiert.

Immunisierungsvorschrift

Kaninchen 1:

100 µg Severin + Freund's Adjuvans (komplett), subcutan ;

Das Antigen wurde aus einem Polyacrylamidgel ausgeschnitten.

nach vier Wochen: 50 µg Severin + Freund's Adjuvans (inkomplett), subcutan;

Kaninchen 2:

15 µg Severin + 100 µl Alugel S, i.v.;

nach einer Woche: 50 µg Severin + 100 µl Pertussis Antigen, i.p.;

nach zwei Wochen: 50 µg Severin, ohne Adjuvans, i.v.;

Meerschweinchen 1:

50 µg Severin + Freund's Adjuvans (komplett), subcutan;

Meerschweinchen 2:

50 µg Severin + 100 µl Alugel S, i.p.;

Die Blutentnahme für die Gewinnung der Antisera erfolgte jeweils eine Woche nach der letzten Immunisierung.

Man läßt das Blut einige Stunden bei 10°C gerinnen und zentrifugiert das Serum bei niedriger Umdrehungszahl kurz ab.

2.7. Radioimmunoassay

Der Test wurde in Mikrotiterplatten aus PVC (Dynatech) durchgeführt. Pro Öffnung wurden 100 µl Antigenlösung (50 µg/ml) pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und 2 Std. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Entfernen der Antigenlösung wurde die Platte mehrmals mit PBST-Puffer (PBS + 0,05% Tween 20) gewaschen. Anschließend wurden die verschiedenen Antikörperlösungen in die Löcher der Mikrotiterplatte pipettiert. Die mit Parafilm verschlossene Platte wurde über Nacht inkubiert (RT). Nach Entfernen der Antikörperlösung wurden die Platten mehrmals mit PBST gewaschen. Pro Vertiefung wurden dann 100 µl einer mit ^{125}J markierten Schaf-anti-Maus Antikörperlösung (SAM, 10^6 cpm/ml) pipettiert. Die Inkubationszeit betrug mindestens zwei Stunden. Gewaschen wurde mehrmals mit PBST. Die einzelnen Vertiefungen wurden aus der Mikrotiterplatte ausgeschnitten, und ihre Radioaktivität wurde im β -Zähler

bestimmt. Als Kontrolle dienten mit Antigen beschichtete Vertiefungen, die mit Medium, PBST, oder einem bereits getesteten, positiven Kulturüberstand inkubiert wurden.

2.8. Immunoblot

Gelelektrophoretisch getrennte Proteine werden auf Nitrozellulose transferiert und mit radioaktiv markierten Antikörpern inkubiert. Das Autoradiogramm zeigt die Proteinbanden, an die Antikörper gebunden sind.

Nach Auftrennung der Proteine in einer Polyacrylamidgel-Diskelektrophorese (10% oder 12% (w/v) Polyacrylamid) unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970), wurden die Proteine elektrophoretisch auf Nitrozellulose (BA85, Schleicher & Schüll) transferiert (Towbin et al., 1979). Der Transfer wurde bei 48 V/cm in 30 mM Tris/Glycin, pH 8,3 und 20% (v/v) Methanol in zwei Stunden durchgeführt. Gekühlt wurde mit einer Kühlschleife oder im Eisbad. Die Transferdauer hing von der Dicke des Gels und dem Molekulargewicht der zu transferierenden Proteine ab. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose in NCP (10 mM Tris-HCl, 0,9% (w/v) NaCl, 0,05% (w/v) Tween 20, 0,02% (w/v) NaN₃, pH 8,0) gewaschen.

Die Nitrozellulose wurde mindestens zwei Stunden lang in der ¹²⁵J-markierten Antikörperlösung (1x10⁶cpm/ml) inkubiert (RT). Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde mehrmals mit NCP gewaschen. Die getrocknete Nitrozellulose wurde mit einem X-Omat AR5 Film exponiert (bei -80°C, mit Verstärkerfolie). Bei der indirekten Markierung wurde zunächst über Nacht mit unverdünntem Hybridomakulturüberstand oder Antiserum der Verdünnungen 1 : 100, 1 : 1000 oder 1 : 10.000 inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in NCP folgte die Inkubation mit der ¹²⁵J-markierten SAM-Lösung bzw. GAR-Lösung (1 x 10⁶ cpm/ml, 6 Std.).

2.9. Kompetierungstest

Nitrozellulosestreifen, an die das Antigen gebunden war (t_0 -Zellhomogenat von AX2, 100 μ g Protein pro Spur, s. Immunoblot), wurden mit einem Gemisch aus unmarkiertem und radioaktiv markiertem monoklonalen Antikörper (IgG) inkubiert. Der unmarkierte Antikörper wurde im Überschuß dazu gegeben, das waren 160 μ g IgG pro Ansatz. Vom jodierten Antikörper wurden 5×10^5 cpm pro Ansatz hinzugegeben. Vier monoklonale Antikörper wurden auf diese Weise miteinander getestet. Als Kontrolle diente die Inkubation mit einem Gemisch von markiertem und unmarkiertem IgG desselben monoklonalen Antikörpers. Die Nitrozellulosestreifen wurden mit einem X-Omat AR5 Film (Kodak) exponiert. Die Autoradiogramme wurden mit einem Scanner (LKB, Uvikon) ausgewertet.

2.10. Inhibitionstest

In diesem Test sollte die Wirkung der monoklonalen Antikörper auf die viskositätserniedrigende Aktivität von Severin untersucht werden.

Zuerst wurde in einem Vorversuch die Severinkonzentration bestimmt, die im Viskositätstest eine Viskositätserniedrigung auf 50 % des Kontrollwertes (s. 2.3.) hervorrief. Ebenso mußte geprüft werden, ob die IgG-Lösungen allein einen Einfluß auf die Aktinpolymerisation hatten. Pro Versuchsansatz von 100 μ l Gesamtvolumen wurde die Severinkonzentration eingestellt, die im Vorversuch eine Viskositätserniedrigung um 50 % bewirkt hatte. Das waren 20 ng Severin pro 100 μ l Versuchsansatz. Das Verhältnis Severin zu IgG wurde variiert, indem von jedem Antikörper bei gleichbleibender Severinkonzentration verschiedene Mengen eingesetzt wurden (20 ng, 40 ng, 80 ng, 200 ng IgG). Mit PBS wurde auf 100 μ l aufgefüllt. Die Inkubationsdauer der Proben betrug 30 Min. auf Eis. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der anstelle der IgG-Lösung PBS enthielt. Von dieser Kontrolle wurden verschiedene Volumina entnommen, um im Viskositätstest

das Volumen zu bestimmen, mit dem die Viskosität einer F-Aktinlösung auf 50% erniedrigt wurde. Auf diese Weise wurde der Einfluß von PBS auf die Viskosität der Aktinlösung berücksichtigt. Von den Proben wurde in den folgenden Viskositätstests (s.o.) das Volumen eingesetzt, durch das die Viskosität der F-Aktinlösung des Kontrollansatzes auf 50 % erniedrigt worden war.

2.11. "Screening" einer λ gt 11 cDNA-Bank

2.11.1. "Screening" mit monoklonalen Antikörpern

Der Phage λ gt11 erlaubt die Expression von Fremdproteinen als Fusionsprotein mit β -Galaktosidase (Young und Davies, 1983). Nahe am Ende des β -Galaktosidase-Gens befindet sich eine EcoRI- Schnittstelle, die für die Klonierung von EcoRI-Fragmenten verwendet werden kann. Durch die Insertion von Fremd-DNA wird die Produktion von funktionsfähiger β -Galaktosidase verhindert. Befindet sich die inserierte DNA im Leserahmen der β -Galaktosidase, wird bei der Translation ein Fusionsprotein aus β -Galaktosidase und "Fremdprotein" gebildet. Die Wahrscheinlichkeit, daß in einem rekombinanten Phagen das der mRNA entsprechende Protein translatiert wird, ist 1 : 6. Wenn das lac Z-Gen mit Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert wird, kann das Fusionsprotein exprimiert und mit Antikörpern nachgewiesen werden.

Eine cDNA-Bank von *D.discoideum* AX3 in dem Expressionsvektor λ gt 11 stand zur Verfügung. Sie wurde von M.-E. Lacombe und R. Kessin aus poly-A⁺ RNA aggregationkompetenter *D.discoideum* Zellen konstruiert (Lacombe et al., 1986).

Diese Bank wurde mit vier gegen Severin gerichteten monoklonalen Antikörpern getestet. Es handelte sich dabei um die Antikörper mAK 101-211-1, mAK 101-460-2, mAK 102-200-1 und mAK 102-425-1. Wie aus dem Kompetitionstest hervorgeht (s.3.3.), werden von diesen Antikörpern drei verschiedene Epitope erkannt. Das Ausbringen und Testen der Phagen wurde nach dem Protokoll von Young und

Davies (1983) durchgeführt.

Pro NZYM-Agarplatte, 12 cm x 12 cm, (pro 1 NZYM-Agar: 10 g NZ Amin, 5 g NaCl, 1 g Casaminoacids, 5 g Yeast extract, 2 g MgSO₄, 15 g Agar, pH 7,5) wurden 1×10^4 pfu der rekombinanten Phagen ausgebracht. Die Phagen wurden zuvor 30 Min. mit 300 µl Bakteriensuspension (*E.coli*, Stamm Y1088) inkubiert. Für die Bakteriensuspension wurde eine Übernachtskultur der Indikatorbakterien Y1088 in NZYM-Medium + Ampicillin + 0,4% Maltose abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in der Hälfte des Ausgangsvolumens an 10 mM MgSO₄ aufgenommen.

Nach dem Ausplattieren wurde 3-4 Std. bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden trockene Nitrozellulosefilter, die in 10 mM IPTG getränkt worden waren, auf die Agarplatten gelegt und etwa 8 Std. inkubiert (37°C). Die Filter wurden dann nach eindeutiger Markierung ihrer Lage auf der Agarplatte entfernt und mehrmals in NCP gewaschen. Anschließend wurden die Filter 2 Std. mit einem Gemisch der vier ¹²⁵J-markierten monoklonalen Antikörper (s.o.) inkubiert (RT). Pro Antikörper wurden 5×10^5 cpm/ml eingesetzt. Die Filter wurden in NCP gewaschen und nach dem Trocknen mit einem Kodak X-Omat AR5 Film exponiert. Plaques, die auf der Autoradiographie eine Schwärzung hervorriefen, wurden in eine Pasteurpipette aufgenommen und durch wiederholtes Ausbringen und Testen angereichert.

2.11.2. "Screening" mit spezifischer DNA

Um einen vollständigen cDNA Klon zu finden, wurde die cDNA Bank mit dem nicktranslatierten (s.2.20.) Severin-spezifischen cDNA-Fragment getestet (Maniatis et al., 1983). Im Unterschied zu der oben beschriebenen Methode legte man nun unbehandelte Nitrozellulosefilter kurz auf die Agarplatten (30 Sek.), gab sie für 30-60 Sekunden in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl) und neutralisierte anschließend in 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 + 1,5 M NaCl (5 Min.). Nach wiederholtem Waschen (je 5 Min.) in 2xSSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat,

pH 7,0) wurden die Nitrozellulosefilter auf Filterpapier (Whatman 3MM) getrocknet und eine Stunde bei 80°C gebacken. In 50% Formamid- und 2xSSC-haltigem Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 2xSSC, 1% Sarcosyl, 4 mM EDTA, 0,1% SDS, 4 x Denhardt's, 0,12 M Natriumphosphat, pH 6,8) wurde 3 Stunden bei 37°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit dem markierten DNA-Fragment erfolgte unter den gleichen Bedingungen über Nacht (Maniatis et al., 1983). Die hybridisierten Filter wurden zweimal in 2xSSC + 0,1% SDS und unter stringenten Bedingungen bei 37°C in 50% Formamid enthaltendem Hybridisierungswaschpuffer (50% FA, 2xSSC, 2mM EDTA, 0,2% SDS, 1% Sarcosyl, 0,12 M Natriumphosphat, pH 6,8) gewaschen.

2.12. Vermehrung und Aufreinigung von rekombinanten λ gt 11 Phagen

Im Kulturüberstand befindliche Phagenpartikel werden mit PEG gefällt und zweimal durch isopyknische CsCl-Gradientenzentrifugation bandiert, bevor die Phagen-DNA nach Standardmethoden isoliert wird (Maniatis et al., 1983).

3 ml einer Übernachtskultur von *E.coli* (Stamm Y1088) wurden mit 2×10^6 pfu des λ gt 11 Klons angeimpft und 30 Min. inkubiert (RT). Bakterien und Phagen wurden dann zu 300 ml (vorgewärmtem) NZYM-Medium gegeben und 30 Min. bei 42°C geschüttelt (270 rpm/Min.). Dann wurde die Kultur bei 37°C bis zur vollständigen Lyse (etwa 4 - 5 Stunden) weiterwachsen gelassen. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Zur Aufarbeitung der Phagen wurden 60 g NaCl zu einem Liter Kultur gegeben und 20 Min. bei 10.000g abzentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, zu dem Überstand wurden 70 g PEG pro Liter hinzugegeben und anschließend wurde wie oben abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml SM-Puffer (pro l: 5,8 g NaCl, 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5, 5 ml 2%ige Gelatine), der 1 mg DNase und 5 mg RNase enthielt, aufgenommen und erneut abzentrifugiert (SS 34, 13000 rpm, 10 Min.). Um die

Dichte der Phagenlösung auf 1,3 einzustellen, wurden zum Überstand 3,2 g CsCl gegeben und das Volumen mit SM auf 8 ml gebracht. Die Lösung wurde dann in Zellulosenitratröhrchen transferiert und vorsichtig mit 2 ml einer CsCl-Lösung der Dichte 1,5 und 1 ml Lösung der Dichte 1,7 unterschichtet. Im Ausschwingrotor (Beckman, SW 41) wurde eine Stunde bei 36.000 rpm und 15°C zentrifugiert. Die Phagenbande wurde abgezogen, ein Volumen gesättigte CsCl-Lösung hinzugefügt und mit CsCl-Lösung der Dichte 1,7 auf 5 ml Endvolumen gebracht. Der zweite Stufengradient setzte sich folgendermaßen zusammen: 5 ml der Dichte 1,3, 2 ml der Dichte 1,5 und 5 ml der Phagenlösung. Die Zentrifugation erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie vorher. Nach der Zentrifugation wurde die Phagenbande abgezogen und gegen Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) dialysiert. Nach Phenolextraktion wurde die hochmolekulare Phagen-DNA vorsichtig unter Drehen mit Ethanol gefällt (1/10 Volumen NaAc, pH 5,2 + 2,5-faches Volumen Ethanol). Der DNA-Faden wurde auf eine zugeschmolzene Pasteurpipette gedreht, und in 500 µl bis 1 ml TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst.

2.13. Subklonierung der cDNA-Fragmente in die Plasmide pUC 19 und pGem 4

Die DNA der rekombinanten λ gt 11 Phagen wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI in 10 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT (Maniatis et al., 1983) geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 % igen Agarose Gel (TB-Puffer: 0,089 M Trisborat, 0,089 M Borsäure, 2 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt (Maniatis et al., 1983). Nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid wurde das gewünschte Fragment elektroeluiert (s. 2.24.). Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration (260 nm) wurden 150 ng des Fragments und 50 ng EcoRI geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA ligiert.

Zusammensetzung des Ligationsansatzes:

- 1 µl Plasmid (pUC 19: Yanisch-Perron et al., 1985; pGem 4: Promega Biotec)
- 3 µl Fragment
- 2 µl 10fach Ligationspuffer (0,5 M Tris-HCl, pH7,4, 0,1 M MgCl₂, 0,1 M DTT)
- 2 µl BSA (1 mg/ml)
- 2 µl ATP (10 mM)
- 8 µl aqua bidest.
- 2 µl = 2U T4 Ligase

Zunächst wurde 90 Min. bei RT und anschließend 1 Std. bei 37°C inkubiert.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM hinzugefügt.

200 µl kompetente Zellen (s. 2.21.) des *E.coli* Stammes JM 83 wurden mit 1/5 des Ligationsansatzes wie unter 2.22. beschrieben transformiert. Da sowohl pUC 19 als auch pGem 4 das lac Z Gen enthalten, kann auf weiße Kolonien selektioniert werden. Die transformierten Zellen wurden auf Ampicillinplatten (10 g Difco Bactotrypton, 5 g Oxoid Hefeextrakt, 5g NaCl + 1l H₂O, 100 mg Ampicillin) ausgebracht, die mit 20 µl einer 2 %igen X-Gal-Lösung + 20 µl einer IPTG-Lösung (20 mg/ml) imprägniert worden waren.

2.14. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1978) oder nach Holmes und Quigley (1981) isoliert und durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt.

2.14.1. Plasmid-Präparation nach Holmes und Quigley

Bakterienzellen werden durch kurzes Erhitzen auf 100°C denaturiert. Die

chromosomale DNA koaguliert mit Zellwandmaterial und wird abzentrifugiert. Im Überstand befindliche lösliche Nukleinsäuren (verschiedene RNAs, Plasmid-DNA) werden gefällt.

5 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (SS 34, 7000 rpm, 5 Min., 4°C) und in 350 µl STET (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 8% Saccharose, 5% Triton X-100, steril filtriert) + 25 µl Lysozymlösung (10 mg/ml TE) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde 45 Sek. im kochenden Wasserbad erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Es folgte eine Zentrifugation in der Eppendorfszentrifuge (10 Min.). Zum Überstand wurden 5 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) und anschließend ein Volumen Phenol/ Chloroform (1:1) hinzugefügt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 5 Min. in der Eppendorfszentrifuge (RT) zentrifugiert. Die DNA wurde mit Chloroform extrahiert, abzentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 5 Min., RT) und in 360 µl aqua bidest. aufgenommen. Anschließend wurde die DNA mit Isopropanol gefällt (40 µl 5M Ammoniumacetat + 1ml Isopropanol, 15 Min. bei -20°C). Nach Abzentrifugation wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen unter Vakuum in 30 µl TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Bei der Maxi-Präparation wurde von 250 ml Übernachtskultur ausgegangen; die Volumina der Puffer und Lösungen wurden entsprechend erhöht.

2.14.2. Plasmid-Präparation nach Birnboim und Dolby

Bakterienzellen werden mit Lysozym und NaOH/SDS denaturiert; freigesetzte RNA und Plasmid-DNA wird gefällt.

5 ml Übernachtskultur der transformierten Zellen wurden abzentrifugiert (SS 34, 7000 rpm, 5 Min., 4°C). Die Zellen wurden in 2,5 ml TNE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt. Das Sediment wurde in 100 µl Lysozym-Lösung (20 mg/ml TE) resuspendiert und 5 Min. inkubiert (RT). Anschließend wurden 200 µl frisch zubereitete SDS-Lösung (1% SDS in 0,2M NaOH)

hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen wurden sofort 150 µl 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,8 (NaAc) hinzugegeben, gemischt und 5 Min. auf Eis inkubiert. Zentrifugiert wurde in der Eppendorf-Zentrifuge (15 Min. bei 4°C). Der Überstand wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt und unter den gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert. Die DNA wurde mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol präzipitiert (Inkubation bei RT, 5 Min) und anschließend abzentrifugiert (s.o.). Nach kurzem Trocknen wurde die DNA in 100 µl TE aufgenommen. Es folgte ein Verdau mit RNase (2 µl einer RNase-Lösung (20 mg/ml), 30 Min. bei 37°C). Das Volumen wurde mit 40 µl NaAc und 260 µl aqua bidest auf 400 µl gebracht. Dann wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt und anschließend mit Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit zwei Volumen Ethanol gefällt, nach dem Waschen kurz getrocknet und in 20 µl TE aufgenommen.

2.14.3. "Cleared Lysate" Plasmidisolierung

500 ml einer Übernachtskultur der transformierten *E.coli* in LB-Medium (10 g Difco Bactotryptone, 5 g Oxoid yeast extract, 5 g NaCl + 1 l H₂O) wurden abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml TS (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 25% Saccharose) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Ti 70 Zentrifugenröhrchen transferiert. 5 mg Lysozym (in 1 ml 250 mM Tris, pH 8,0 gelöst) wurden hinzugefügt und der Ansatz 5 Min. auf Eis stehen gelassen. Dann wurden 2,8 ml 250 mM EDTA, pH 8,0 hinzugegeben und 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 8,8 ml eiskalter Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 60 mM EDTA, 2% Triton X-100) hinzugegeben. Die Zentrifugation erfolgte im Ti 70 Rotor bei 45.000 rpm und 4°C für 30 Minuten. Der Überstand wurde mit 6 ml eiskalter PEG-Lösung (30% PEG in 1,5 M NaCl versetzt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Im SS 34 Rotor wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 15 Min.). Das Sediment wurde in 4 ml TE aufgenommen. 1 ml dieser Lösung wurde mit 1 g CsCl und 80 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und anschließend im SS 34 Rotor (8000 rpm,

10 Min.) zentrifugiert. Der Überstand wurde in VTi65 Zentrifugenröhrchen ("quick-seal") gefüllt. Zentrifugiert wurde im VTi65 Rotor (55.000-60.000 rpm, 10 Std, 20°C). Die untere DNA-Bande wurde abgezogen, und das Ethidiumbromid mit 20xSSC gesättigtem Isopropanol extrahiert. Über Nacht wurde gegen TE dialysiert. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt (OD_{260}). Die Ausbeute lag bei etwa 3 mg DNA pro 500 ml Kultur. 1 OD_{260} entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.15. Isolierung von genomischer DNA aus *D.discoideum* Zellkernen

Bei der verwendeten Methode (Noegel et al., 1985) werden die Zellen mit Detergens lysiert, die Kerne abzentrifugiert und in einer EDTA-Sarcosyl-Lösung aufgeschlossen. Die DNA wird im CsCl-Gradienten bandiert und anschließend gefällt.

D.discoideum Amöben wurden pelletiert (Hettich Laborzentrifuge, 1500 rpm, 5 Min.) und zweimal in kaltem aqua bidest. gewaschen. Dann wurden die Zellen in kaltem Kernlysispuffer (10 mM Magnesiumacetat, 10 mM NaCl, 30 mM Hepes, 10% Saccharose, 2% NP40, pH 7,5) vorsichtig lysiert, um die Kernmembran nicht zu zerstören (50 ml Puffer/5-10 ml gepackte Zellen). Die Kerne wurden abzentrifugiert (GSA, 9000 rpm, 10 Min., 4°C), in 4 ml Kernlysispuffer aufgenommen und in 500 µl Aliquots zu 20 ml 65°C heißer EDTA-Sarcosyl-Lösung (0,2 M EDTA, pH 8,4 + 2 % Sarcosyl) gegeben. 22 g CsCl (0,92 g/ml) wurden zugefügt und durch vorsichtiges Schütteln des Falconröhrchens im Wasserbad (65°C) gelöst. Zu dem auf Raumtemperatur abgekühlten Ansatz wurde 1 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gegeben. Anschließend wurde im 60Ti Rotor (45000 rpm, 48 Std., 15°C) zentrifugiert. Die DNA-Bande wurde mit einer weiten Pipettenspitze abgehoben und mit dem gleichen Volumen TE versetzt. Die DNA wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Ethanol (RT) und vorsichtiges Mischen gefällt. Die DNA, die als kompakter Faden vorlag, wurde dann mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette entfernt, mit 70%

Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE gelöst.

2.16. RNA-Isolierung

Die Zellen werden in SDS/DEP aufgeschlossen; die RNA wird durch Phenolextraktion und verschiedene Fällungen gereinigt. Die Reduktion der Ribonuklease-Aktivität auf ein Minimum ist eine wesentliche Voraussetzung für eine gute RNA-Präparation. Aus diesem Grunde wurden nur sterile Lösungen und wenn möglich RNase-freie Chemikalien verwendet, aqua bidest. wurde mit DEP behandelt (s. Maniatis et al., 1983). Das Tragen von Handschuhen ist unumgänglich.

Das Sediment von 1×10^6 Zellen von *D.discoideum* verschiedener Entwicklungsstadien wurde in 20 ml eiskaltem Hepespuffer (50 mM Hepes, pH 7,5, RNasefrei) resuspendiert und die Zellen mit 1 ml einer 10 %igen SDS-Lösung + 200 µl DEP lysiert (60 Sek. vortexen). Der Ansatz wurde mit 10 ml Phenol (gesättigt mit Hepes, pH 7,4) versetzt und 60 Sekunden "gevortext". Anschließend wurden 10 ml Chloroform hinzugefügt und in der Hettich-Laborzentrifuge zentrifugiert (4000 rpm, 10 Min.). Die Phenolextraktion wurde zweimal wiederholt. Die RNA wurde mit Ethanol gefällt, das Präzipitat nach der Zentrifugation (SS 34, 15.000 rpm, 5 Min.) in aqua bidest. (mit DEP behandelt) gelöst und mit gleichem Volumen 8 M LiCl versetzt. Unter diesen Bedingungen wird ausschließlich RNA gefällt. Das Präzipitat wurde in aqua bidest. gelöst.

2.17. Southern Transfer und Hybridisierung

Beim Southern Transfer werden gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf Nitrozellulose transferiert und irreversibel gebunden (E.M.Southern, 1975).

Genomische DNA von *D.discoideum* wurde nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen

elektrophoretisch (1 - 2 V/cm) in 0,8 %igen Agarosegelen mit TB (89 mM Trisborat, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) oder TP (36 mM Tris, 300 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,8) als Puffer aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht photographiert. Dazu wurde ein Lineal neben das Gel gelegt, um die Größe der im Autoradiogramm sichtbaren Fragmente bestimmen zu können. Die DNA wurde nach der Methode von Southern (1975) auf Nitrozellulose transferiert. Dazu wurde die DNA zunächst denaturiert, d.h. in Einzelstränge getrennt, indem das Gel 30 Min. in 0,5 N NaOH + 1,5 M NaCl bewegt wurde. Neutralisiert wurde in 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 + 3 M NaCl für 30 Min., wobei der pH-Wert kontrolliert wurde. Als Transferpuffer diente 20xSSC. Nach dem Transfer wurde das Nitrozellulosefilter in 6xSSC gewaschen (zweimal), an der Luft auf Filterpapier (Whatman 3MM) getrocknet und zwischen Whatman-Papier 3 Std. bei 80°C gebacken. Das Filter wurde anschließend mit einem nicktranslatierten DNA-Fragment hybridisiert. Dazu wurde es zunächst in Hybridisierungspuffer prähybridisiert (3 Std. 37°C), die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 2xSSC, 1 % Sarcosyl, 4 mM EDTA (pH 7,2), 4xDenhardt's, 0,12 M Natriumphosphat). Gewaschen wurde zweimal in 2xSSC + 0,1% SDS und anschließend unter stringenten Bedingungen eine Std. bei 37°C in 50% Formamid- und 2xSSC- haltigem Hybridisierungswaschpuffer. Die Filter wurden mit Kodak X Omat-AR5 Filmen exponiert (mit intensitätsverstärkenden Folien (Cronex Quanta IV, Dupont) bei -80°C).

2.18. Northern-Blot-Analyse

2.18.1. Formaldehyd RNA Gel

Die isolierte mRNA wurde in 1,2 %igen Agarosegelen in Gegenwart von 6 % Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt. Für 200 ml 1,2 %ige Agarose wurden 148 ml aqua bidest. (DEP behandelt), 20 ml 10x RNA-Gelpuffer (200 mM MOPS,

50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 8,0, autoklaviert, RNasefrei), 2,4 g Agarose, 32 ml Formaldehyd benötigt. Als Laufpuffer diente ein Puffer gleicher Zusammensetzung wie der RNA-Gelpuffer, jedoch pH 7,0. Pro Gelspur wurden 10 µg RNA aufgetragen. Das maximale Auftragsvolumen beträgt 45 µl. Vor dem Auftragen wurde die Probe mit 15 µl Denaturierungspuffer (250 µl Formamid, 83 µl 36%iges Formaldehyd, 50 µl 10x Gelpuffer) versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 60°C wurde 1 µl Farbstoffmarker (0,3% Bromphenolblau, 0,3% Xylencyanol) hinzugefügt.

Laufdaten: 30 Volt, über Nacht;

2.18.2. Transfer

Der Transfer ist dem Southern Transfer vergleichbar (P.Thomas, 1980). Das Gel wurde nach dem Lauf 5-10 Min. in aqua bidest. bewegt. Das gleiche Volumen 20xSSC wurde hinzugefügt, und das Gel wurde weitere 5 - 10 Min. leicht bewegt. Der Transfer der RNA wurde in 20xSSC genauso durchgeführt wie der Southern Transfer (s.o.).

2.18.3. Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde wie unter 2.17. beschrieben durchgeführt.

2.19. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der DNA wurde nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Dideoxymethode im Plasmid (Chen und Seeburg, 1985) durchgeführt.

2.19.1 Vorbereitung des Templates

2 µg Plasmid-DNA wurden mit 2 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA (pH8,0)) versetzt. Mit aqua bidest. wurde das Volumen auf 40 µl gebracht, anschließend 15 Minuten bei RT inkubiert. Die DNA wurde mit 1/10 Volumen 2 M Ammoniumacetat, pH 4,6 (eiskalt) und dem 2,5 fachen Volumen Ethanol (eiskalt) gefällt (15 Min., -20°C), dann in der Eppendorfzentrifuge (10 Min., 4°C) abzentrifugiert. Mit 70%igem Ethanol (eiskalt) wurde gewaschen. Die DNA wurde unter Vakuum kurz getrocknet und stand für die Sequenzreaktion bereit.

2.19.2. Anhybridisieren des Primers und Polymerase Reaktion

Das molare Verhältnis zwischen Template und Primer sollte zwischen 1:5 und 1:10 liegen. Die denaturierte Plasmid-DNA wurde in 1 µl Oligonukleotidprimer (5 pMol/ml) + 1,6 µl 10 x "annealing"Puffer (70 mM Tris-HCl, pH 7,5, 70 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 100 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0) + 13,4 µl aqua bidest. aufgenommen (Primermix). Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz 5 Minuten auf Eis gestellt. Vier Eppendorfgefäße wurden mit G, A, T oder C beschriftet und in jedes Gefäß wurden 2 µl des entsprechenden dNTP/ddNTP-Mixes + 3,9 µl Primermix + 2 µl Klenow-Mix (2 µl ³⁵S-dATP (10 µCi/µl) + 2 µl Klenow-Polymerase (5 U/µl) + 4,5 µl H₂O) gefüllt (s. Tabelle auf S.31). Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 45°C wurden 2 µl Chase-Mix (0.125 mM dNTP, alle vier) hinzugegeben und weitere 15 Min. bei 45°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mit je 3 µl Formamid-Farbstoff (98% Formamid, 10 mM EDTA, pH 8,0, 0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol) versetzt. Anschließend wurde im geöffneten Eppendorfgefäß 15-20 Min. bei 80°C inkubiert. Nach dieser Denaturierung wurde von jeder Probe 1 µl auf das Sequenzgel aufgetragen.

Zusammensetzung der dNTP/ddNTP Mischungen

Nukleotid	A-Mix		C-Mix		G-Mix		T-Mix	
	µl	µmol/l	µl	µmol/l	µl	µmol/l	µl	µmol/l
dTTP	40	100	40	100	40	100	2	5
dCTP	40	100	4	10	40	100	40	100
dGTP	40	100	40	100	2	5	40	100
ddTTP	-	-	-	-	-	-	50	500
ddCTP	-	-	10	100	-	-	-	-
ddGTP	-	-	-	-	12	120	-	-
ddATP	10	100	-	-	-	-	-	-
"annealing"-								
Puffer 10x	20		20		20		20	
H ₂ O	50		50		50		50	

2.19.3. Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurden 60 cm lange, 0,38 mm dicke, 6 % Polyacrylamid enthaltende Gradientengele verwendet. Der Puffergradient reichte von 0,5x TBE bis 6x TBE (1x TBE = 0,1 M Tris, 0,083 M Borsäure, 1 mM EDTA) (Boehringer Mannheim, Guidelines for quick and simple plasmid sequencing, 1987). Die Gelplatten wurden nach gründlichem Reinigen mit Detergenz, Abspülen mit aqua dest. und Ethanol, mit einem Papiertuch getrocknet. Auf die Glasplatte, an die das Gel binden sollte, wurden 5 ml Bindesilanlösung (17,5 µl γ -methacryloxypropyltrimethylsilan, 175 µl 10 %ige Essigsäure, 5 ml Ethanol) aufgetropft, mit einem Papiertuch verrieben und 10 Min. trocknen gelassen. Anschließend wurde die Platte nochmals mit Ethanol abgespült, getrocknet und mit einem Papiertuch poliert. Auf die zweite Platte wurden 5 ml einer 5%igen Dimethyldichlorosilanlösung in Chloroform appliziert. Dabei wurde genauso wie bei der Behandlung mit Bindesilan verfahren.

Zum Auftragen der Proben auf das Polyacrylamidgel wurde ein sogenannter Haifischzahnkamm benutzt, der während der Polymerisation des Gels umgekehrt, d.h. mit der glatten Kante, auf der Polyacrylamidlösung lag. Die Polymerisationszeit betrug etwa eine Stunde. Vor dem Auftragen der Probe wurde der Kamm entfernt, die glatte Kante des Gels gründlich aber vorsichtig mit aqua dest. gespült, und der Kamm mit den Zähnen etwa 0,5 mm tief ins Gel gesteckt. Anschließend wurde das Gel in die Gelapparatur montiert und beide Pufferkammern wurden mit 1xTBE gefüllt. Die Auftragsaschen wurden gut mit Puffer gespült, um nicht polymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Bei 40 mA wurde 30 Min. vorelektrophoresiert. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Auftragsaschen nochmals mit Puffer gespült, um aus dem Gel diffundierten Harnstoff zu entfernen. Von jeder Probe wurde möglichst schnell 1 µl aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 2500 Volt, 58 Watt und einer Temperatur von ca. 60°C durchgeführt. Nachdem der Bromphenolblaufarbstoff das Ende des Gels

erreicht hatte, wurde der Lauf gestoppt. Bromphenolblau wandert bei den gewählten Bedingungen wie ein Fragment von 30 Basenpaaren Länge, Xylencyanol wie eines von 120 Basenpaaren Länge.

Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten voneinander getrennt. Um den Harnstoff aus dem Polyacrylamidgel zu entfernen, wurde das an der mit Bindesilan beschichteten Platte haftende Gel etwa 10 Min. in 10%iger Essigsäure leicht bewegt. Mit aqua dest. wurde nachgewaschen, und anschließend wurde bei 80°C im Trockenschrank zwei Std. getrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein Kodak-film (XAR) gelegt, der über Nacht exponiert wurde.

2.19.4. Aufreinigung von synthetischen Oligonukleotiden

Die zum Sequenzieren verwendeten Oligonukleotide wurden nach der Methode von Matteucci and Caruthers (1981) synthetisiert. Die Aufreinigung erfolgte mit der HPLC auf einer C18 Säule (5 µm, Organogen, Heidelberg). Anschließend wurden die Tritylgruppen abgespaltet.

Pro Sequenzreaktion wurden 5 pMol des Oligonukleotids eingesetzt.

2.20. Nicktranslation

Mit dieser Methode wurden aus Agarosegelen isolierte DNA-Fragmente mit $\alpha^{32}\text{P}$ dATP markiert (Rigby et al., 1977).

Pipettierschema:

2 µl 10x NTP (500 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 40 mM DTT)

2 µl dC,G,TTP (2,5 mM)

5 µl α³²P dATP (10µCi/µl)

1 µl DNA (= 0,5 µg DNA)

4 µl DNase (0,1 µg/ml)

1 µl DNA Polymerase I (0,1 - 0,5 µg)

5 µl aqua bidest

Die Inkubationsdauer betrug bei 15°C eine Std., danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (600 µl TE, pH 8,0 + 24 µl 0,5 M EDTA) gestoppt.

Die Abtrennung der Mononukleotide wurde auf einer Sephadex-Säule (Pharmacia, G 50, 1 ml Säulenvolumen) vorgenommen. Die Probe wurde in der Hettichzentrifuge (2000 rpm, 2 Min., 4°C) durch das Säulenmaterial zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Erhitzen (100°C, 5 Min.) denaturiert.

2.21. Kompetente Zellen

1 ml einer Übernachtskultur von *E.coli*, Stamm JM 83, wurde in 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₅₅₅ = 0,48 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (SS 34, 4000 rpm, 5 Min., 4°C). Das Zellsediment wurde in 7,5 ml eiskaltem Tfb1 (100 mM RbCl, 45 mM MnCl₂, 35 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 0,5 mM LiCl, 15% Glycerin, pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure) aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation wurde unter den gleichen Bedingungen wie oben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem Tfb2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% Glycerin, pH 7,0 mit 0,1 N NaOH) resuspendiert. Aliquots von 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.22. Transformation

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 200 μ l Zellen wurden mit einem Viertel des Ligationsansatzes versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschockbehandlung bei 43°C (3 Min.) wurden pro Ansatz 500 μ l LB-Medium hinzugefügt. Zur Expression des β -Lactamase Gens wurde der Ansatz 30-60 Min. bei 37°C inkubiert. Auf Amp-Platten wurden 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l und 350 μ l des Ansatzes ausgebracht.

2.23. Agarosegele (Maniatis et al., 1982)

0,3 - 0,5 % Agarose: Auftrennung hochmolekularer DNA

0,8 - 1,0 % Agarose: genomischer Southernttransfer

1,5 % Agarose: Northernttransfer

Puffer: TB, TP, RNA-Gelpuffer

Apparatur: Horizontalbett, submers;

Minigele: 15 ml/Gel

große Gele: 200 ml /Gel

angelegte Spannung: 10-15 V/cm bei DNA niedrigen Molekulargewichtes;

5 V/cm bei hochmolekularer DNA;

1- 2 V/cm bei Gelen für Southern- und Northern-
transfer;

2.24. Elektroelution aus Agarosegelen (Dretzen et al., 1981)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung (10 μ g/ml) angefärbt, dann unter UV-Licht unmittelbar ober- und unterhalb der Bande von Interesse durchgeschnitten. Anionenaustauscherpapier (DE 81) von geeigneter Größe wurde vor und hinter der zu eluierenden

Bande zwischen das Gel gelegt. Der Laufpuffer wurde bis auf etwa ein Drittel aus der Elektrophoresekammer entfernt. Der Kontakt zwischen Gel und Puffer wurde mittels eines Filterpapiers hergestellt. Die Elektroelution wurde eine Stunde lang bei 200 V durchgeführt. Das DE81-Papier, das das gewünschte Fragment trug, wurde in ein Eppendorfgeläß gegeben, in dessen Boden ein Loch gestanzt worden war und dieses in ein zweites Eppendorfgeläß gestellt. Es wurde viermal mit je 100 µl Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M LiCl) in der Eppendorfschleuse gewaschen. Die gebundene DNA wurde viermal mit je 100 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 M LiCl, 20% Ethanol) eluiert. Dazu wurde 5-10 Min. bei RT inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 30 µl TE aufgenommen.

2.25. Zellbiologische Methoden

2.25.1. Lichtstreuungsmessung

Die von Gerisch und Hess (1974) beschriebene Technik wurde angewendet. Mit dieser Methode ist es möglich, Lichtstreuungsänderungen einer Zellsuspension, die durch Veränderungen der Zellform hervorgerufen werden, aufzuzeichnen.

2 ml einer Zellsuspension von aggregationskompetenten *D.discoideum* Zellen (5×10^7 Zellen/ml) wurden in eine Küvette gefüllt. Durch diese Küvette wurde kontinuierlich wassergesättigter Sauerstoff geleitet (20 ml O₂/Min.). In einem Photometer wurde die optische Dichte der Zellsuspension bei 500 nm und deren Veränderung nach cAMP-Zugabe (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M cAMP) gemessen.

2.25.2. Chemotaxis

Die Zellen wurden nach der von Gerisch und Keller (1981) beschriebenen Methode mit cAMP stimuliert.

Aggregationskompetente, axenisch gewachsene *D.discoideum* Zellen der Mutante HG1132 (t_6 , 1×10^4 Zellen/ml) wurden in eine Teflon-beschichtete Petrischale (Heraeus) gegeben. Die Spitze einer mit 10^{-3} Mol/l cAMP gefüllten Mikrokapillare wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators in der Zellsuspension positioniert und diente als cAMP-Quelle. Die Reaktion der Zellen auf den cAMP-Reiz wurde mit dem Mikroskop beobachtet. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach Anbringung der Mikropipette photographiert.

2.25.3. Motilität

Das zur Bestimmung der Motilität verwendete Bildverarbeitungssystem ist so programmiert, daß die Bewegungen von *D.discoideum* Amöben, die im Mikroskop beobachtet werden, automatisch verfolgt und bestimmt werden (Paul Fisher, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe einer von P. Fisher konstruierten Chemotaxis-Kammer ist es möglich einen stabilen, linearen cAMP Gradienten innerhalb von 30 Minuten aufzubauen. Der Gradient bleibt mindestens weitere 90 Minuten stabil. Die Steilheit des Gradienten betrug $2,5 \times 10^{-8}$ M cAMP/mm, und die mittlere Konzentration von cAMP am Ort der Messung war $2,5 \times 10^{-8}$ M. Für die Messung von Wendehäufigkeit (T) und Orientierung wurden Amöben mit einer Geschwindigkeit von $\geq 2,9$ μ m/Min. ausgewählt, um eine fehlerfreie Bestimmung der Bewegungsrichtung zu gewährleisten. Mit dieser Methode können Motilität und Chemotaxis einer großen Anzahl von Amöben in einem Experiment untersucht und statistisch ausgewertet werden.

2.26. Herstellung einer genomischen Bank

Die Genbank wurde nach der Vorschrift der Firma Genofit angelegt. Je 10 µg genomische DNA von HG1132 wurden zur Herstellung von partiell geschnittener DNA mit 0,3 U, 0,6 U und 1,2 U Sau3AI verdaut (1 Std./37°C). Die Reaktion wurde mit EDTA (Endkonzentration = 10 mM) gestoppt. Die drei Ansätze wurden vereinigt. Ein Aliquot wurde zur Kontrolle des Sau3AI-Verdaus auf ein 0,8%iges Agarose-Gel aufgetragen. 20 µg EMBL4-DNA wurden mit BamHI und Sall geschnitten, mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und 0,7 Volumen Isopropanol gefällt, um die kurzen DNA-Fragmente zwischen der BamHI- und der Sall-Schnittstelle zu entfernen. Hierdurch wird verhindert, daß der EMBL4-Vektor später religiert. Zur Ligation (s.2.13.) wurden 5 µg Vektor-DNA und 1 µg Insert-DNA eingesetzt. Etwa 1/5 des Ligationsansatzes wurde mit einem Verpackungsextrakt (Genofit) vereinigt. 10⁴ pfu wurden zusammen mit 10⁸ Zellen von *E.coli*, Stamm LE392 auf eine Agarplatte (85 mm Durchmesser) ausplattiert. Es wurden insgesamt 1,6 x 10⁵ pfu ausgebracht, die durch Hybridisierung mit dem nicktranslatierten EcoRI-Fragment aus λcDS1 "gescreent" wurden (s.2.17.). Gewaschen wurde in 2xSSC + 0,1% SDS für 15 Min. bei 42°C. Klone, die im Autoradiogramm eine Schwärzung hervorriefen, wurden in eine Pasteurpipette aufgenommen und durch wiederholtes Ausbringen angereichert.

2.27. Andere Methoden

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951). Als Standard diente Rinderserumalbumin.

2.28. Sonstiges

Zur Herstellung von Medien und Lösungen wurde deionisiertes H₂O verwendet. Die

für DNA-Arbeiten verwendeten Lösungen und Glasgeräte wurden vor Gebrauch sterilisiert.

Die Bromcyanspaltung von Severin wurde von M. Schleicher, Martinsried und die Ansequenzierung des Severin-Peptids von F. Lottspeich, Martinsried durchgeführt.

2.29. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Bio Rad, Boehringer, Calbiochem, Hoechst, Merck, Pharmacia, Polysciences, Seakem, Serva, Sigma und Whatman. DNA-modifizierende Enzyme wurden von Boehringer, New England Biolabs und BRL bezogen. Radiochemikalien wurden von Amersham geliefert. $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP hatte eine spezifische Aktivität von 5000Ci/mMol.

Die Medien für die Hybridomakulturen stammten von Gibco.

3. Ergebnisse

3.1. Reinigung von Severin

Als Ausgangsmaterial dienten 30 l Zellkultur aggregationskompetenter AX2 Zellen, die 400 bis 450 g gepackte Zellen ergaben. Die Reinigung wurde wie unter 2.4. beschrieben durchgeführt. Alle Schritte der Proteinreinigung wurden auf Eis bzw. mit eiskalten Puffern bei +6°C im Kühlraum durchgeführt.

Die löslichen Proteine wurden zunächst auf einer DEAE-Zellulose-Säule chromatographisch aufgetrennt. Da Severin nicht an die DEAE-Säule bindet, konnte seine Aktivität mit Hilfe des Viskositätstests im Durchfluß nachgewiesen werden. Nach Ammoniumsulfatfällung wurden die mit 60% bis 80% Ammoniumsulfat gefällten Proteine auf eine Hydroxyapatitsäule gegeben. Severin bindet an Hydroxyapatit und wurde mit einem KPO_4 -Gradienten bei einer Leitfähigkeit von etwa 13 mS eluiert (Abb.2). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und auf eine PC-Säule gegeben, die mit einem NaCl-Gradienten eluiert wurde. Severin wurde bei einer Leitfähigkeit von 6,5 - 7,5 mS eluiert (Abb.2). Die im Viskositätstest aktiven Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert und im letzten Reinigungsschritt auf einer Sephacryl-Gelfiltrationssäule chromatographiert. Die Ausbeute an gereinigtem Severin betrug etwa 1,5 mg/30 l Zellkultur.

Abb.1 zeigt das Schema für die Severinreinigung.

SEVERIN - AUFREINIGUNG

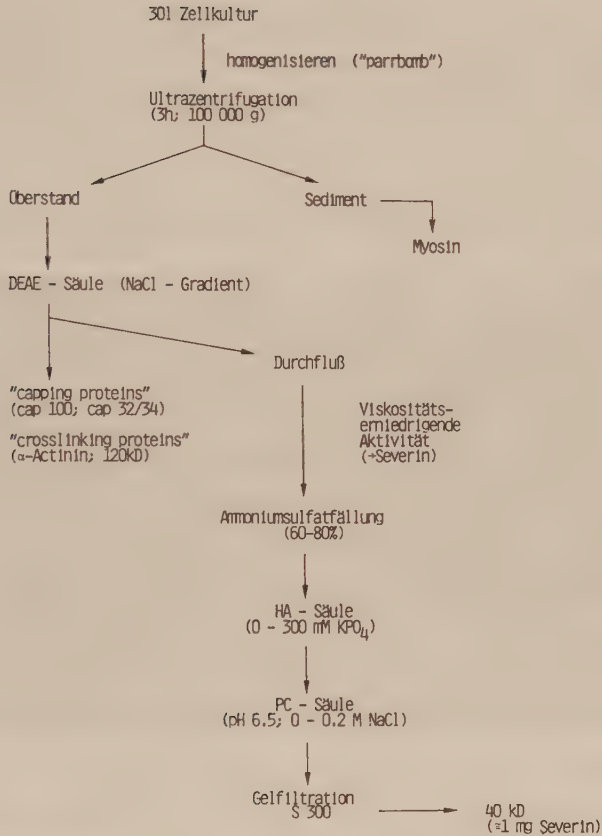


Abb.1: Reinigung von Severin

DEAE = Diethylaminoethylzellulose, HA = Hydroxyapatit,
PC = Phosphozellulose

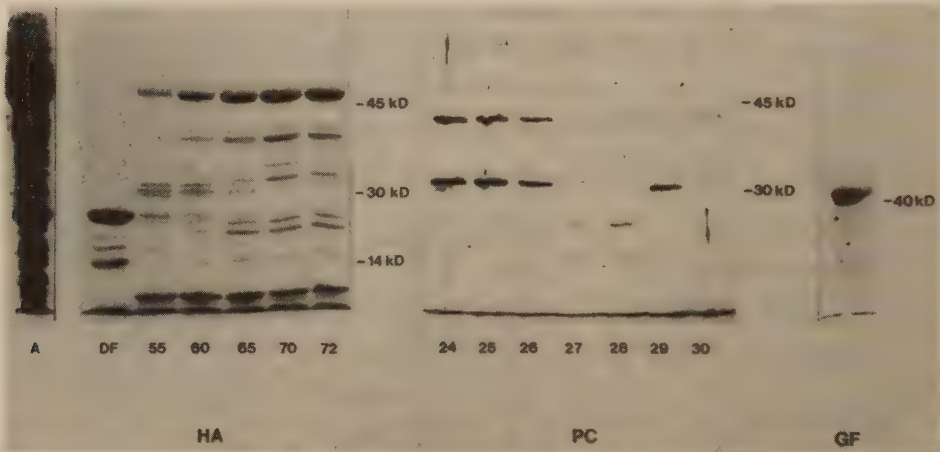
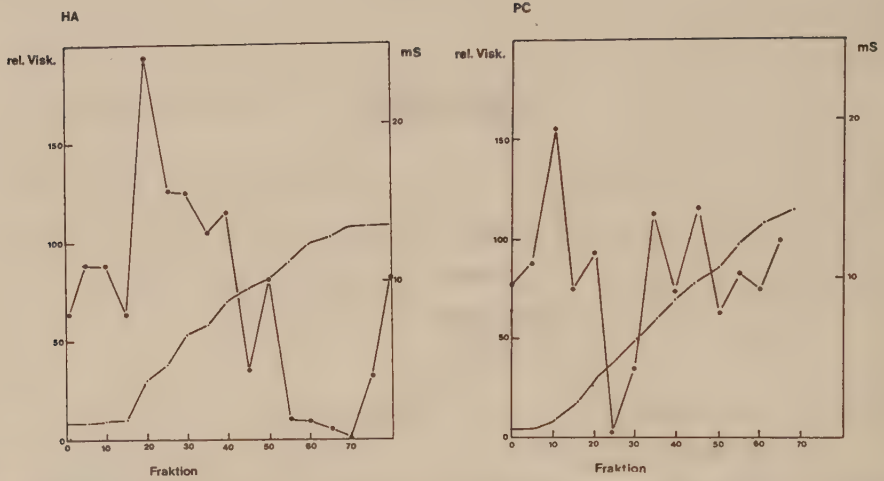


Abb.2: Chromatographie des 60-80% Ammoniumsulfatpräzipitats auf Hydroxyapatit- und Phosphozellulose-Säule.
A: Bei etwa 13 mS wird Severin von der Hydroxyapatitsäule eluiert. Von der PC-Säule wird Severin bei der Leitfähigkeit 6,5 -7,5 mS eluiert.
B: SDS-PAGE von Säulenauftrag, Säulendurchfluß und der im Viskositätstest aktiven Fraktionen der Hydroxyapatit-Säule (je 5 µl wurden auf das 12 %ige Gel aufgetragen). SDS-PAGE der aktiven Fraktionen von Phosphozellulose-Säule (je 5 µl, 12 % iges Gel) und Gelfiltration (5 µl, 10 %iges Gel).
A=Auftrag; DF=Säulendurchfluß; GF=Gelfiltration; HA=Hydroxyapatit; PC=Phosphozellulose.

3.2. Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden wie unter 2.5. beschrieben hergestellt. In 871 der 960 angeimpften Costarlöcher waren Hybridomazellen gewachsen, deren Antikörperproduktion im RIA getestet wurde. 123 verschiedene Kulturüberstände gaben im RIA ein Signal, das deutlich über dem Hintergrund lag. Die im RIA positiven Kulturüberstände wurden auch im Immunoblot getestet um nachzuweisen, daß die Antikörper gegen Severin gerichtet sind. Dazu wurden sowohl durch SDS-Gelelektrophorese getrennte Proteine aus Zellhomogenat als auch gereinigtes Severin auf Nitrozellulose transferiert. Hybridomazellen, deren Kulturüberstände im Immunoblot eine Severin zuzuordnende Bande bei 40 kD markierten, wurden kloniert. Das war bei Überständen von 22 Costarlöchern der Fall. Nach Klonierung und Anwachsen der klonierten Zellen in Mikrotiterplatten wurden die Überstände nochmals getestet.

Es wurden 14 Hybridomaklone eingefroren, die gegen Severin gerichtete Antikörper produzieren. Von diesen Antikörpern zeigten bis auf den mAK 101-284-1, der mit einem Protein mit höherer Molmasse kreuzreagierte, alle im Immunoblot mit *D.discoideum* Zellhomogenat nur eine Bande (Abb.3). Die folgenden Versuche wurden mit den monoklonalen Antikörpern mAK 101-211-1, mAK 101-460-2, mAK 102-200-1 und mAK 102-425-1 durchgeführt (Abb.3).

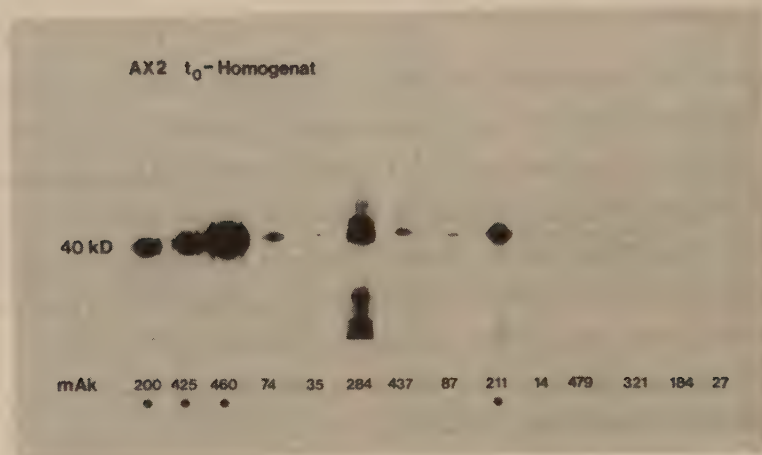


Abb.3: Autoradiogramme von Immunoblots von Wildtyp-AX2 Zellhomogenat. Die Zellen wurden am Ende der Vermehrungsphase geerntet und die Proteine durch SDS-PAGE (10 % w/v) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit verschiedenen Hybridoma-Kulturüberständen über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Nitrozellulose mit ^{125}J -markierter Schaf-anti-Maus Antikörper-Lösung (1×10^6 cpm/ml) 6 Std. inkubiert. Pro Gelspur wurden 100 μg Gesamtprotein aufgetragen.

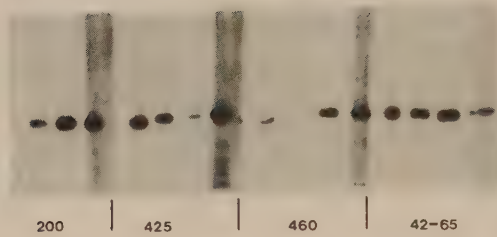
3.3. Konkurrenz zwischen den monoklonalen Antikörpern

Der Test wurde durchgeführt wie unter 2.7. beschrieben. Die Autoradiogramme wurden mit Hilfe eines Gel-Scanners ausgewertet (Abb.4). Nach Inkubation des Nitrozellulosestreifens mit einem bestimmten, markierten Antikörper im Gemisch mit einem Überschuß desselben, unmarkierten Antikörpers, wird auf den Autoradiogrammen ein schwaches Signal sichtbar. Die Konkurrenz erreicht in diesem Fall das Maximum (++++). Eine Konkurrenz ist auch zwischen mAK 102-200-1 und mAK 101-460-2 erkennbar (+++). Das Signal auf den Autoradiogrammen ist deutlich reduziert, unabhängig davon, welcher der beiden Antikörper im jodierten oder

unmarkierten Zustand vorliegt. Aus dem Ergebnis dieses Tests kann jedoch nicht zwingend eine Identität der von den Antikörpern erkannten Epitope abgeleitet werden, da auch die Bindung an räumlich benachbarte Epitope wegen sterischer Behinderung einer Kompetition unterliegt. Die monoklonalen Antikörper 102-425-1 und 42-65-23 kompetieren mit keinem der anderen Antikörper so stark wie mit sich selbst.

3.4. Inhibition der Severinaktivität durch mAK 102-200-1

Mit jedem Antikörper wurden drei Experimente wie unter 2.10. beschrieben durchgeführt. Abb.5 zeigt das Ergebnis. Mit steigender IgG-Konzentration von mAK 102-200-1 im Versuchsansatz nimmt die durch Severin hervorgerufene Viskositätserniedrigung ab. Die relative Viskosität steigt von 50 % (Kontrolle) auf 91 % wenn das Verhältnis Severin zu mAK 1:10 beträgt. Die beiden anderen getesteten Antikörper, mAK 101-460-2 und mAK 102-425-1, zeigten keinen Einfluß auf die viskositätserniedrigende Aktivität von Severin.



^{125}I	200	460	425	42-65
200	++++ 0.1	+++ 0.8	+ 3.1	++ 2.2
460	+++ 0.3	++++ 0.0	+ 1.5	+ 1.7
425	+ 2.4	++ 1.3	++++ 0.2	++ 1.9
42-65	+ 2.8	++ 1.5	++ 1.8	++++ 0.5

Abb.4: Kompetierungstest der monoklonalen Antikörper. Gesamtprotein von t_0 -Zellhomogenat wurde nach elektrophoretischer Auftrennung auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Gemisch der beiden zu testenden Antikörper inkubiert. Einer der beiden mAK lag unmarkiert und im Überschuß vor, der andere war mit ^{125}J radioaktiv markiert (1×10^6 cpm/ml). Die Autoradiogramme wurden mit Hilfe eines Scanners ausgewertet. Die Zahlenwerte in der Tabelle entsprechen der Fläche unter dem Signalpeak. Aus der Tabelle geht hervor, daß die Antikörper 200 und 460 miteinander kompetieren, während mAK 425 und 42-63 mit keinem der getesteten Antikörper eine stärkere Competition als mit sich selbst zeigen.

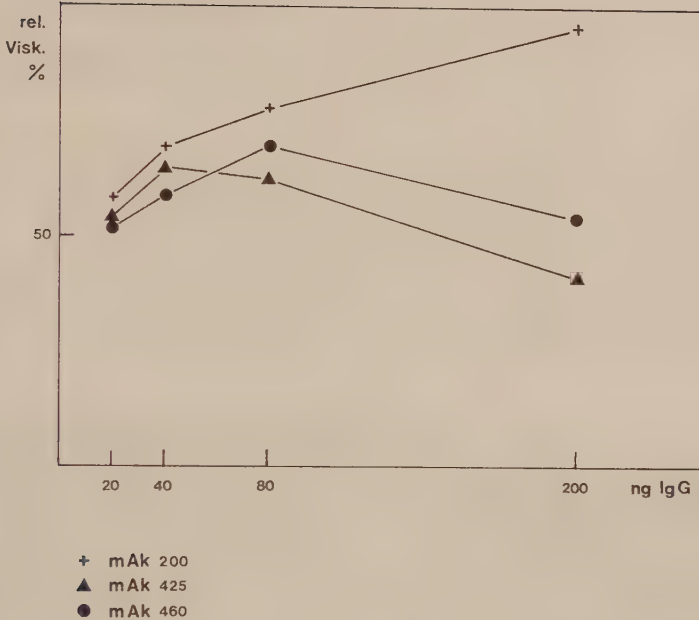


Abb.5: mAK 102-200-1 inhibiert die Severinaktivität.

Die inhibierende Wirkung des Antikörpers wurde im Viskositätstest bestimmt. Die pro Experiment eingesetzte Menge an Severin reduziert die Viskosität der Aktinlösung auf 50%. Das Verhältnis Severin-Menge (20 ng) zu IgG-Menge war 1:1, 1:2, 1:4 und 1:10. Durch mAK 102-200-1 wird die viskositätserniedrigende Wirkung von Severin mit steigender IgG-Menge aufgehoben. Die Antikörper 102-425-1 und 101-460-2 zeigen keine eindeutige Wirkung auf die Severin-Aktivität.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (Lowry et al., 1951).

3.5. Isolierung von Severin-spezifischen cDNA-Klonen

Eine von Lacombe und Kessin (Lacombe et al., 1985) aus polyA⁺-RNA von aggregationskompetenten Zellen des *D.discoideum* Stammes AX3 konstruierte cDNA-Bank im λ gt11 Phagen stand zur Verfügung.

a): "Screening" der λ gt11 Expressionsbank mit monoklonalen Antikörpern

Es wurden $2,4 \times 10^7$ pfu der cDNA-Bank ausgebracht und ein Klon, λ cDS1, gefunden.

Beim "Screening" mit Antikörpern ist zu beachten, daß die Plaquedichte auf den Agarplatten nicht zu hoch ist. Es sollte keinesfalls eine konfluente Lyse erreicht werden. Abb.6 zeigt, wie ein stark angereicherter Klon, in hoher Dichte ausgebracht (1×10^4 pfu), nach Inkubation mit der Antikörperlösung nur ein sich schwach vom Hintergrund abhebendes Signal hervorrief. Bei einer 1:100 Verdünnung der Phagensuspension (100 pfu) waren die Plaques gut zu erkennen.

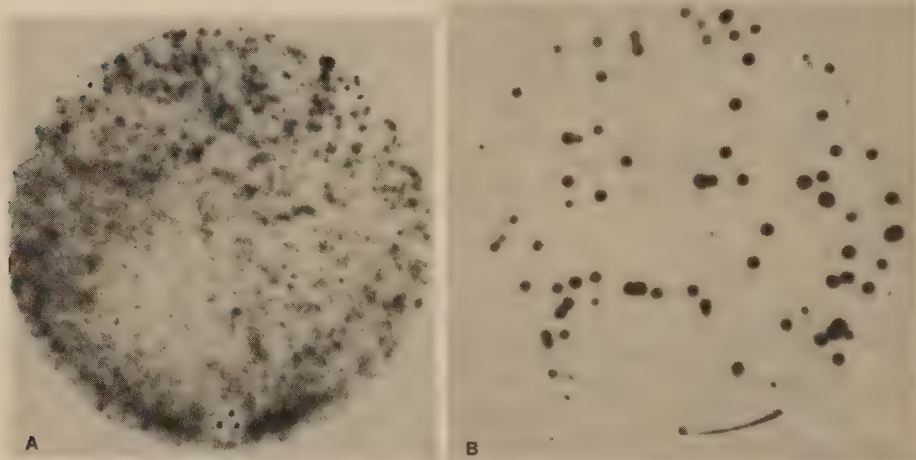


Abb.6: Abhängigkeit der Signalstärke von der Plaquedichte. Identisches Phagenlysat wurde in unterschiedlicher Verdünnung ausgebracht, 5 Stunden bei 42°C inkubiert und die Nitrozellulosefilter in derselben Antikörperlösung inkubiert. A = unverdünnt, 1×10^4 pfu; B = 1:100 verdünnt.

b) "Screening" mit einer nicktranslatierten spezifischen DNA

Da sich bei der Charakterisierung von λ cDS1 (s.3.6.) herausstellte, daß dieser Klon nicht die gesamte kodierende Region des Severin-Strukturgens enthält, wurde das Eco RI-Fragment aus Klon cDS1 mit $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP markiert und zum weiteren "Screening" der cDNA-Bank verwendet. Auf diese Weise wurden noch die Klone λ cDS2 und λ cDS4 gefunden.

3.6. Charakterisierung der λ gt11 Klone

Nach Aufreinigung der rekombinanten Phagen wurde die Phagen-DNA mit EcoRI geschnitten und in einem präparativen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die nach Anfärben mit Ethidiumbromid bei etwa 1,0 kB (cDS1) und 1,4 kB (cDS2 und cDS4) aufleuchtenden Banden wurden elektroeluiert. Die Größe der EcoRI-Inserts wurde mit 0,92 kB für cDS1, 1,2 kB für cDS2 und 1,4 kB für cDS4 errechnet (Abb.7).

Laut SDS-Gel beträgt die Molmasse von Severin 40 kD. Demnach sollte die kodierende Sequenz des Severin-Gens etwa 1,2 kB lang sein. Das bedeutet, daß der Klon λ cDS1 nicht die vollständige mRNA repräsentiert. Auch wenn man davon ausgeht, daß ein cDNA-Klon mit polyA-Schwanz eine 100 bis 200 Basenpaare umfassende nicht kodierende Region enthält, sollte wenigstens Klon λ cDS4 vollständig sein.

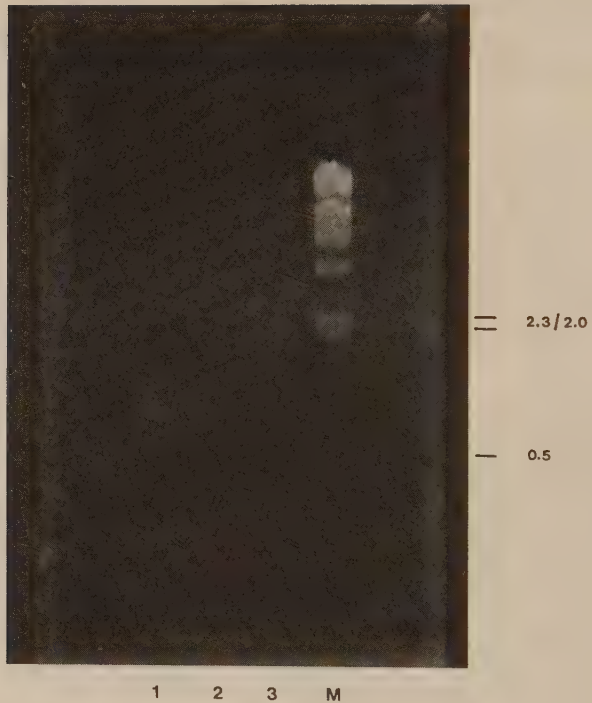


Abb.7: Größe der Inserts der Severin-spezifischen cDNA-Klone.
Die EcoRI-Inserts der 3 isolierten cDNA-Klone wurden auf
einem 0,8%igen Agarose-Gel (TB-Puffer) aufgetrennt. Als
Längenstandard diente mit HindIII geschnittene λ -DNA.
1=cDS1, 2=cDS4, 3=cDS3; M= HindIII-geschnittene λ -DNA.

3.7. Immunreaktion der Fusionsproteine mit den monoklonalen Antikörpern

Um festzustellen, welcher der vier zum "Screening" der cDNA-Bank verwendeten monoklonalen Antikörper mit dem Fusionsprotein von λ cDS1 reagiert, wurden die Phagen erneut ausgebracht (s. 2.11.). Das IPTG-Filter wurde in vier Teile geschnitten, und jedes Teil mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert. So konnte gezeigt werden, daß nur mAK 101-460-2 mit dem Fusionsprotein von cDS1 reagiert (Abb.8).

Die beiden mit Hilfe des nicktranslatierten EcoRI-Fragments gefundenen cDNA-Klone wurden ebenfalls noch einmal ausplattiert, und die Expression des Fusionproteins wurde mit IPTG induziert. Die Wahrscheinlichkeit, daß die Fusionsproteine prinzipiell von Antikörpern erkannt werden können, d.h., daß der Klon im richtigen Leserahmen vorliegt, ist 1:6. Das Fusionsprotein von cDS2 zeigt eine Immunreaktion mit mAK 101-460-2 und 102-200-1. Aufgrund dieses Ergebnisses kann man die Severinbindungsstelle von mAK 102-200-1, dem Antikörper der die Severinaktivität inhibiert, 5'-aufwärts vom Ende des Klons cDS1 lokalisieren. Zur genaueren Lokalisierung s. 3.10. (Sequenzanalyse der cDNA Klone).

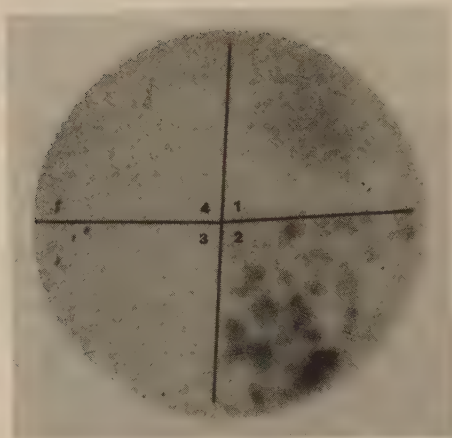


Abb.8: Reaktion des Fusionsproteins von λ cDS1 mit mAK 101-460-2. 1×10^4 pfu von λ cDS1 wurden ausgebracht und 4 Std. bei 42°C inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Inkubation mit einem IPTG-getränkten Filter (8 Std., 37°C) induziert. Das Filter wurde in 4 Teile geschnitten, und jedes Teil mit einem anderen ^{125}J -markierten monoklonalen Antikörper (5×10^5 cpm/ml) inkubiert (2 Std., RT). Nur das Autoradiogramm des mit mAK 101-460-2 inkubierten Filters zeigt eine durch die Bindung des Antikörpers bedingte Schwärzung.
1=Inkubation mit mAK 101-211-1, 2=Inkubation mit mAK 101-460-2, 3=Inkubation mit mAK 102-425-1, 4=Inkubation mit mAK 102-200-1.

3.8. Genomische Organisation von Severin

Filtergebundene genomische DNA von AX2, die mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut worden war, wurde mit dem Insert cDS1 hybridisiert. Die Ergebnisse weisen daraufhin, daß nur ein Gen für Severin kodiert. Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI, BamHI, AccI und XbaI war nach Hybridisierung der Nitrozellulose mit dem nicktranslatierten cDS1-Insert im Autoradiogramm

nur eine Bande sichtbar, während nach dem Verdau mit HindIII zwei Banden sichtbar wurden (Abb.9). Die Hybridisierung der nicktranslatierten cDS1-DNA zur kleineren Bande der mit HindIII geschnittenen DNA ist sehr schwach. Dieser Befund ist möglicherweise mit der Lage der HindIII-Schnittstelle zu erklären, die sich 123 Basenpaare entfernt vom 5'-Ende von cDS1 befindet. Diese Erklärungsmöglichkeit wird auch durch Resultate von A. Noegel (persönliche Mitteilung) unterstützt.

Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Sequenzdaten für cDS1, cDS2 und cDS4, nach denen von den verwendeten Restriktionsenzymen nur HindIII eine Erkennungssequenz in der kodierenden Region des Severingens besitzt.

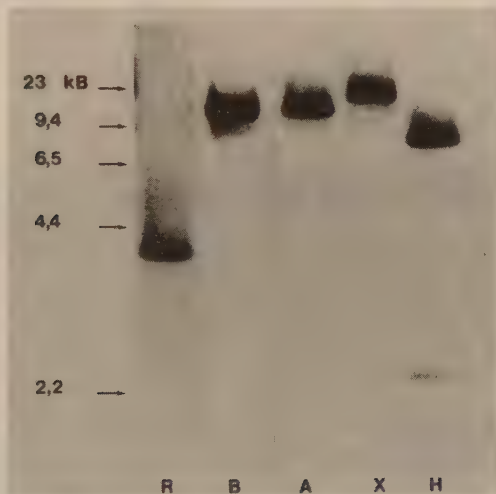


Abb.9: Nachweis des Severin-Gens als Einzelkopie-Gen. Chromosomale DNA (10 µg) von *D.discoideum* AX2 wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI (R), BamHI (B), AccI (A), XbaI (X) und HindIII (H) verdaut, nach elektrophoretischer Auftrennung (1% Agarose, Trisphosphat-Puffer) auf Nitrozellulose transferiert und mit nicktranslatierter cDS1-DNA hybridisiert. Als Marker dienen die Restriktionsfragmente von HindIII verdauter λ-DNA.

3.9. Größe der mRNA und Transkription des Severin-Gens während der *Dictyostelium* Entwicklung

An Nitrozellulose gebundene RNA aller Entwicklungsstadien von AX2 wurde mit dem nicktranslatierten EcoR1-Fragment cDS1 hybridisiert. Die RNA hat eine Größe von etwa 1,4 kb und kann zu allen Zeitpunkten der Entwicklung nachgewiesen werden. Mit Beginn der Entwicklung (3 Std.) nimmt der Gehalt an RNA zu und erreicht sein Maximum mit Aggregationsbeginn (9 Std.). Die RNA kann bis zur Fruchtkörperbildung (21 Std.) detektiert werden (Abb.10).

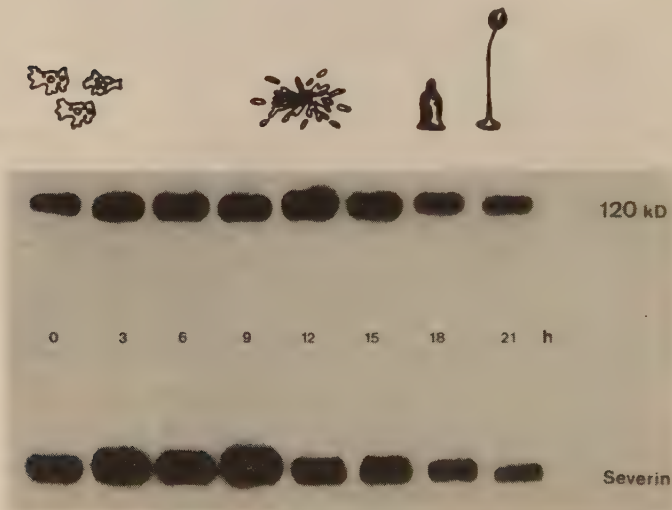


Abb.10: Expression der Severin mRNA während der Entwicklung von *D.discoideum* AX2
Gesamt-RNA verschiedener Entwicklungsstadien (t₀ bis t₂₁) von AX2 wurde unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch (1,5% Agarose) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und zu nicktranslatierter cDS1-DNA hybridisiert. Dieselbe Nitrozellulose wurde anschließend zu einem α -³²P markierten cDNA-Fragment des Strukturgens für das Aktin-vernetzende Protein "120 kD" hybridisiert.
Pro Gelspur wurden 10 μ g RNA aufgetragen.

Zum Vergleich wurde dasselbe Nitrozellulosefilter anschließend mit einer für das 120 kD-Protein spezifischen DNA hybridisiert. Diese für das 120 kD-Protein kodierende RNA zeigt keine Entwicklungsregulation: Im Autoradiogramm ist die Bande dieser RNA zu allen Zeitpunkten der Entwicklung etwa gleich stark markiert. Dieser interne Vergleich spricht dafür, daß die Akkumulation der Severin-mRNA während verschiedener Entwicklungsstadien unterschiedlich ist, da sich durch Degradation der RNA-Proben oder Auftragung unterschiedlicher RNA-Mengen bedingte Unterschiede nicht nur auf die Severin-mRNA auswirken sollten (Abb.10).

3.10. Sequenzanalyse der cDNA-Klone und ihre Identifizierung als Severin-spezifische Klone

Die Sequenzierung wurde nach der Dideoxymethode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. EcoRI- und HindIII-Fragmente der cDNA-Klone wurden in pUC19 oder pGem4 subkloniert und zunächst mit uni- und reverse-primer ansequenziert. Dann wurden spezifische Oligonukleotidprimer (18 Basen) synthetisiert und zum weiteren Sequenzieren, vor allem des zweiten Stranges verwendet. Abb.11 zeigt das Sequenzierschema.

Das EcoRI-Fragment cDS1 umfaßt 990 Basenpaare; das EcoRI-Fragment cDS2 ist 1121 Basenpaare lang. Mit 1248 Basenpaaren besitzt cDS4 die volle Länge der mRNA. In Position 61 von cDS4 befindet sich das Startcodon ATG, in Position 1149 das Stopcodon TAA, an das sich der polyA-Schwanz anschließt. TAA ist das einzige bisher bei *D.discoideum* gefundene Stopcodon. Die 3'-nichtkodierende Region enthält wiederholt die Basenfolge AAC, die auch in anderen Genen aus *D.discoideum* gefunden wird (Kimmel und Firtel, 1985). Die Bedeutung dieser Folge ist nicht bekannt.

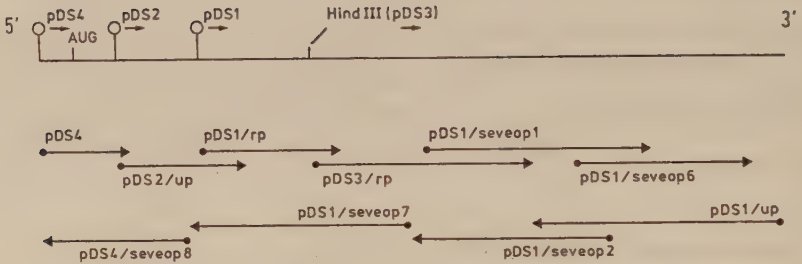


Abb.11: Sequenzierschema

Die Plasmide pDS1, pDS2 und pDS4 enthalten die aus den rekombinanten gt11 Phagen isolierten cDNA-Fragmente. Diese Fragmente wurden in die EcoRI-Schnittstelle von pUC19 kloniert und von beiden Seiten mit "reverse" und "uni-primer" sequenziert. Das Plasmid pDS3 enthält ein 0,8 kB HindIII/EcoRI Fragment von pDS1 subkloniert in HindIII/EcoRI verdauten pUC19 Vektor und wurde auf gleiche Weise sequenziert. Auf Grund der so erhaltenen Sequenzinformationen konnten spezifische Oligonukleotide zur Vervollständigung der Sequenz synthetisiert und als Primer eingesetzt werden.

zu Abb.12: cDNA- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz von Severin. Die Sequenzierung wurde mit der Dideoxymethode nach Sanger et al. (1977) gemäß dem in Abb.11 dargestellten Sequenzierschema durchgeführt. Die durch Proteinsequenzierung erhaltene Sequenz eines N-terminalen Peptids und das Polyadenylierungssignal nahe dem 3'Ende der cDNA sind unterstrichen.

1	TATAATAATAAAATATAGAAAACCTCCATAAAAAATAAAATAAACCTTTGACAAAA																								60
61	ATG	ATT	AAG	AAT	AGA	AAA	TTA	GAT	ATT	ACT	TCA	ACT	AAT	GTG	GCT	GGT	ATT	GGA	ACA	GAT					120
1	M	I	K	N	R	K	L	D	I	T	S	T	N	V	A	G	I	G	T	D					20
121	TTA	GAT	AAA	AAA	TGT	AGA	TTG	GAT	GCA	GCT	TCA	ACT	GAA	GCT	CAA	TGG	AAA	GGT	GTT	GGT					180
21	L	D	K	K	C	R	L	D	A	A	S	T	E	A	Q	W	K	G	V	G					40
181	CAA	GCA	CCA	GGT	CTC	AAG	ATT	TGG	AGA	ATT	GAA	AAT	TTT	AAA	GTY	GTC	CCA	GTT	CCA	GAA					240
41	Q	A	P	G	L	K	I	W	R	I	E	N	F	K	V	V	P	V	P	E					60
241	TCA	TCA	TAT	GGT	AAA	TTC	TAT	GAT	GGT	GAT	AGT	TAT	ATC	ATT	TTA	CAT	ACT	TTT	AAA	GAA					300
61	S	S	Y	G	K	F	Y	D	G	D	S	Y	I	I	L	H	T	F	K	E					80
301	GGT	AAT	TCA	CTT	AAA	CAT	GAT	ATT	CAT	TTT	TTT	TTA	GGT	ACT	TTT	ACT	ACT	CAA	GAT	GAA					360
81	G	N	S	L	K	H	D	I	H	F	F	L	G	T	F	T	T	Q	D	E					100
361	GCT	GGC	ACT	GCT	GCT	TAT	AAA	ACA	GTT	GAA	TTA	GAT	GAT	TTT	TTA	GGT	GGT	GCA	CCA	ATT					420
101	A	G	T	A	A	Y	K	T	V	E	L	D	D	F	L	D	D	F	L	D					120
421	CAA	TAT	CGT	CAA	TGT	CAA	TCA	TAT	GAA	AGT	CCA	AGC	TTT	TTA	TCA	TTA	TTT	CCA	AAA	TAT					480
121	Q	Y	I	Q	C	Q	S	Y	E	S	P	S	F	L	S	L	F	P	K	Y					140
481	TTC	ATT	TTA	TCA	GGT	GGT	GTT	GAA	TCA	GGA	TTT	AAT	CAT	GTG	AAA	CCA	ACA	GAA	TAT	AAA					540
141	F	I	L	S	G	K	V	E	S	G	F	N	H	V	K	V	K	V	K	E					160
541	CCA	AGA	TTA	TTA	CAT	ATT	AGT	GGT	GAT	AAG	AAT	GCT	AAA	GTG	GCT	GAA	GTA	CCA	TTG	GCA					600
161	P	R	L	L	H	I	S	G	D	K	N	A	K	V	A	E	V	P	L	A					180
601	ACC	AGT	TCA	TTG	AAT	AGT	GGT	GAC	TGT	TTT	CTT	TTG	GAT	GCA	GGT	TTA	ACT	ATT	TAT	CAA					660
181	T	S	S	L	N	S	G	D	C	F	L	L	D	A	G	L	T	I	Y	Q					200
661	TTC	AAT	GGT	AGT	AAA	TCA	AGT	CCA	CAA	GAA	AAG	AAT	AAA	GGC	GCT	GAA	GTT	GCA	CGT	GCA					720
201	F	N	G	S	K	S	S	P	Q	E	K	N	K	A	A	E	V	A	R	A					220
721	ATC	GAT	GCA	GAA	AGA	AAA	GGT	TTA	CCA	AAA	GTT	GAA	GTT	TTT	TGT	GAA	ACC	GAT	TCC	GAT					780
221	I	D	A	E	R	K	G	L	P	K	V	E	V	F	C	E	T	D	S	D					240
781	ATT	CCA	GCT	GAA	TTT	TGG	AAA	CTT	TTA	GGT	GGA	AAA	GGT	GCA	ATC	GCT	GCT	AAA	CAC	GAA					840
241	I	P	A	E	F	W	K	L	L	G	G	K	G	A	I	A	A	K	H	E					260
841	ACT	GCC	CCA	ACC	AAA	TCT	GAA	AAA	GTT	TTA	TAC	AAA	TTA	TCA	GAT	GCA	TCT	GGT	TCA	CTT					900
261	T	A	P	T	K	S	E	K	V	L	Y	K	L	S	D	A	S	G	S	L					280
901	AAA	TTC	TCT	GAA	GTT	TCA	CGT	GGT	AAA	ATC	AAT	AAA	TCC	TCA	TTA	AAA	TCT	GAA	GAT	GTT					960
281	K	F	S	E	V	S	R	G	K	I	N	K	S	S	L	K	S	E	D	V					300
961	TTC	ATC	ATT	GAT	TTA	GGT	AAT	GAA	ATC	TAT	ACT	TGG	ATC	GGT	TCA	AAA	TCA	TCA	CAA	AAT					1020
301	F	I	I	D	L	G	N	E	I	Y	T	W	I	G	S	K	S	S	P	N					320
1021	GAA	AAG	AAA	ACA	GCA	TTT	AGT	CAT	GCA	ACT	CAA	TAC	TTG	GTA	AAC	AAT	AAA	CGT	TGT	GAA					1080
321	E	K	K	T	A	F	S	H	A	T	Q	Y	L	V	N	N	K	R	C	E					340
1081	TAT	ACT	CCA	ATA	GTT	AGA	GTT	TTA	GAA	AAT	GGT	ACA	AAT	CAA	TCA	TTT	GAA	ACT	TTA	TTA					1140
341	Y	T	P	I	V	R	V	L	E	N	G	F	E	N	G	F	E	T	L	L					360
1141	TCT	GCT	TAA	TAATAAAACACACACACACACACATTCAAAAATCAATTTTGATCATATAAAATAAAATAAAAT																					1216
361	S	A	*																						362
1217	ATAAAGCTTTATATTATAAAAAAAAAAAAAAA																								1248

Abb.12: Severinsequenz

Anhand der Sequenz ist es möglich, die Bindungsstelle von mAK 102-200-1 auf dem Severin-Molekül zu lokalisieren. Sie befindet sich zwischen Position 130 und 260 der Nukleotidsequenz und somit nicht weit vom N-Terminus entfernt (Abb.13).

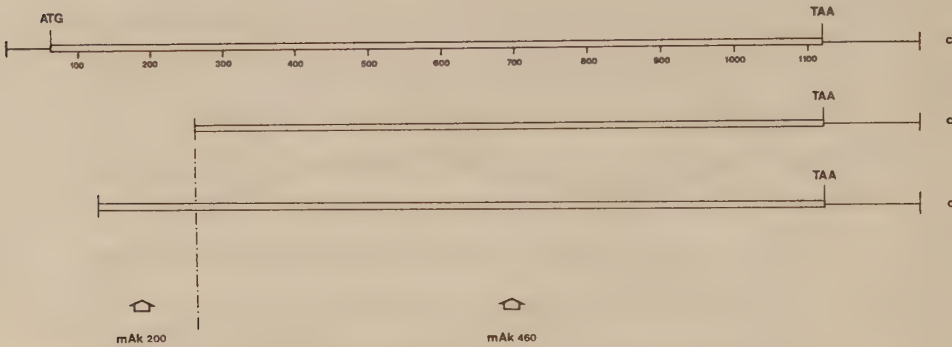


Abb.13: Lokalisation der Bindungsstelle von mAK 102-200-1.
mAK 102-200-1 erkennt das Fusionsprotein von λ cDS2 und zeigt keine Immunreaktion mit dem Fusionsprotein von λ cDS1.
mAK 101-460-2 reagiert mit den Fusionsproteinen beider Klone, wohingegen mAK 101-211-1 und mAK 102-425-1 mit keinem der beiden Fusionsproteine reagieren.
 λ cDS4 liegt nicht im richtigen Leserahmen vor, deshalb kann das exprimierte Protein von den anti-Severin Antikörpern nicht erkannt werden.

Die aus der Sequenz errechnete Masse des Severinmoleküls beträgt 39,9 kD in Übereinstimmung mit dem aus der Mobilität in SDS-Polyacrylamidgelen erhaltenen Wert von 40 kD. Die Aminosäurenanalyse ergab, daß Severin nur ein Methionin enthält (Yamamoto et al., 1982). Dieses Methionin muß das Start-Methionin sein, da in der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz kein zweites Methionin gefunden wurde.

Severin verhält sich wie ein basisches Protein: es bindet bei pH 7,5 und niedriger Ionenstärke nicht an DEAE-Zellulose (Anionenaustauscher) und wird durch einen KCl-Gradienten von der Hydroxyapatit-Säule eluiert. Laut Aminosäureanalyse sollte sich Severin hingegen wie ein saures Protein verhalten (Tab.1). Yamamoto et al. (1982) weisen jedoch darauf hin, daß während der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Severin, Glutamin und Asparagin zu Glutaminsäure und Asparaginsäure hydrolysiert worden sind. Diese Annahme wird durch die Sequenzdaten bestätigt (Tab.1). Das Severinmolekül enthält 16 Asparagin- und 10 Glutamin-Reste und demzufolge hat das Protein eine positive Nettoladung (+7). Die Daten für die übrigen Aminosäuren stimmen gut mit den Sequenzdaten überein (Tab.1).

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung von Severin
Aminosäuren-Analyse
(Yamamoto et al., 1982)

	Sequenzdaten
Asp	32,0
Asn	-
Thr	19,0
Ser	29,1
Glu	32,1
Gln	-
Pro	16,8
Gly	25,5
Ala	24,2
Val	17,0
Cys	4,9
Met	1,0
Ile	17,2
Leu	27,7
Tyr	11,0
Phe	16,7
Lys	29,8
His	6,2
Arg	9,0

Ein zusätzlicher Hinweis auf die Richtigkeit des offenen Leserahmens ist die Übereinstimmung der verwendeten Kodons mit denen anderer bekannter Gene von *D.discoideum* (Tab.2).

Tabelle 2: Kodonhäufigkeit in *D.discoideum*

AS	Kodon	alle	Sev	AS	Kodon	alle	Sev	AS	Kodon	alle	Sev
Gly	GGG	1	0	Glu	GAG	36	0	Val	GTG	5	0
Gly	GGA	27	3	Glu	GAA	450	25	Val	GTA	41	2
Gly	GGT	226	24	Asp	GAT	258	18	Val	GTT	171	15
Gly	GGC	9	1	Asp	GAC	47	1	Val	GAC	81	2
Ala	GCG	0	0	Arg	AGG	1	0	Lys	AAG	133	5
Ala	GCA	46	11	Arg	AGA	77	6	Lys	AAA	308	30
Ala	GCT	200	13	Ser	AGT	57	9	Asn	AAT	167	15
Ala	GCC	109	2	Ser	AGC	15	1	Asn	AAC	110	1
Met	ATG	94	1	Thr	ACG	1	0	Trp	TGG	37	4
Ile	ATA	19	1	Thr	ACA	68	5	End	TGA	0	0
Ile	ATT	173	12	Thr	ACT	143	14	Cys	TGT	76	5
ILE	ATC	116	7	Thr	ACC	120	3	Cys	TGC	14	0
End	TAG	0	0	Leu	TTG	56	5	Ser	TCG	6	0
End	TAA	8	1	Leu	TTA	213	21	Ser	TCA	147	19
Tyr	TAT	76	11	Phe	TTT	92	8	Ser	TCT	103	3
Tyr	TAC	64	2	Phe	TTC	90	11	Ser	TCC	35	2
Arg	CGG	2	0	Gln	CAG	7	0	Leu	CTG	0	0
Arg	CGA	2	1	Gln	CAA	229	10	Leu	CTA	10	0
Arg	CGT	132	4	His	CAT	46	6	Leu	CTT	60	4
Arg	CGC	0	0	His	CAC	24	1	Leu	CTC	112	1
Pro	CCG	1	0								
Pro	CCA	153	15								
Pro	CCT	14	0								
Pro	CCC	1	0								

Die Tabelle beruht auf den Kodonfrequenzen von 12 Genen aus *D.discoideum*, deren vollständige kodierende Sequenzen veröffentlicht sind. (Nach Warrick, 1987)

3.11. Übereinstimmung zwischen der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz und der Sequenz eines Severinpeptids.

Die Übereinstimmung der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der Sequenz des Severin-Strukturgens wurde durch Sequenzierung eines Severinpeptids bewiesen. Der Aminoterminus des Severinmoleküls ist blockiert (F. Lottspeich, persönliche Mitteilung), durch Behandlung des Moleküls mit Bromcyan wurde das Anfangs-Methionin abgespalten. Ein durch Bromcyanspaltung von Severin und anschließende Behandlung mit o-Iodosobenzoessäure erhaltenes Peptid wurde von F. Lottspeich durch Edman-Abbau ansequenziert. Die so bestimmte Teilsequenz des Peptids umfaßt 19 Aminosäuren, beginnt mit einem Isoleucin und ist identisch zu den Aminosäuren der Positionen "2" bis "20" der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz.

3.12. Sekundärstrukturvorhersage nach Chou und Fasman

Um den Faltungsmechanismus eines Proteins und seine biologische Aktivität zu verstehen, ist die Kenntnis der räumlichen Konformation dieses Proteins von Bedeutung. Stehen Proteinkristalle zur Verfügung, so kann die Tertiärstruktur mit kristallographischen Methoden bestimmt werden. Die Möglichkeiten, die native Konformation des Proteins aus Sequenzdaten abzuleiten, sind begrenzt. Mit der von Chou und Fasman (1982) entwickelten Methode ist es möglich, aus der Aminosäuresequenz die Wahrscheinlichkeit von α -Helix- und β -Faltblattstrukturen eines Proteins abzuleiten. In diesem Programm wird jeder der 20 Aminosäuren aufgrund von statistischen Untersuchungen an Proteinen, deren Sekundärstruk-

tur mit optischen Methoden ermittelt wurde, ein α -Helix und β -Struktur bilden-
des Potential ($P\alpha$ bzw. $P\beta$) zugeordnet. Glu, Ala und Leu sind sehr starke
 α -Helix-Bildner, wohingegen Met, Val und Ile starke Faltblattstruktur-Bildner
sind. Außerdem wurden empirische Regeln über die Nachbarschaft solcher
 α -Helix- und β -Struktur-Bildner aufgestellt.

Abb.14 zeigt die Sekundärstrukturvorhersage für die aus der Nukleotidsequenz
abgeleitete Aminosäuresequenz von Severin. Im Severin-Molekül liegen 5 kurze
Regionen mit α -Helix-Struktur vor. Die am stärksten ausgeprägte α -Helix
(sinusförmige Abschnitte des Diagramms) befindet sich zwischen AS 235 und AS
250, einem Bereich der außerdem stark hydrophob (offenes Zeichen) ist. Regionen
mit β -Faltblatt-Struktur (gezackte Abschnitte des Diagramms) sind im Severin-
Molekül stärker ausgeprägt und häufiger vorhanden. Die Positionen der " β -Turns"
gehen aus dem Diagramm ebenfalls hervor. Die Sekundärstrukturvorhersage für
Severin steht in Einklang mit dem Befund, daß die meisten bisher untersuchten
globulären Proteine einen geringen Anteil an α -helicalen Strukturen besitzen
(z.B. Lysozym). Bei größeren globulären Proteinen (z.B. Carboxypeptidase A) findet
man häufig eine ausgedehnte β -Faltblattstruktur, die sich oft im Zentrum des
Moleküls befindet.

zu Abb.14: Sekundärstrukturvorhersage nach Chou und Fasman.
 α -helicale Strukturen ($\sim$) und β -Faltblatt-Strukturen ($\sim$)
des Severin-Moleküls sind markiert. " β -Turns" werden durch
Kettenwindungen angezeigt. Hydrophobe (●) und hydrophile (○)
Regionen sind gekennzeichnet. Die Aminosäurereste der Severin
Sequenz sind nummeriert.

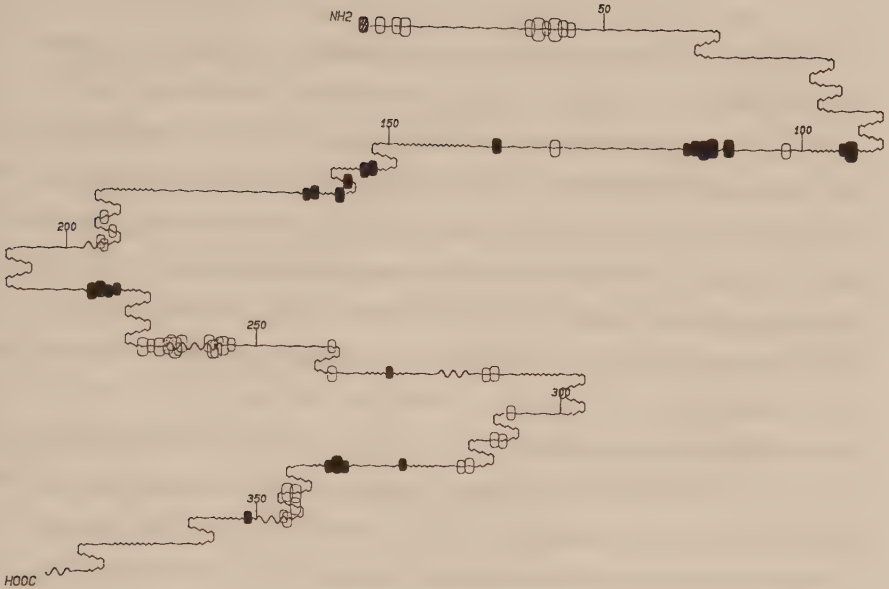


Abb.14: Sekundärstrukturvorhersage nach Chou und Fasman.

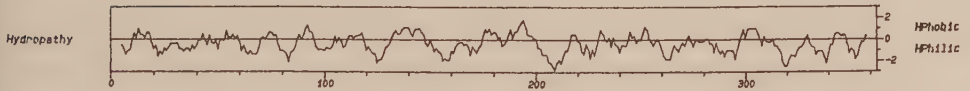


Abb.15: Hydropathie-Skala des Severin-Moleküls.

Die Aminosäurereste der Severin-Sequenz sind nummeriert (0 - 362). Der Hydropathie-Index umfaßt Werte von +2 (hydrophil) bis -2 (hydrophob). Hydrophile Regionen sind über die gesamte Sequenz verteilt. Hydrophobe Bereiche, die möglicherweise innenliegenden Teilen des Moleküls entsprechen, befinden sich vor allem bei AS 95, 120, 195 und 300.

3.13. Bestimmung des hydrophilen Charakters von Severin

Mit Hilfe eines von Kyte und Doolittle (1982) aufgestellten Computerprogramms ist es möglich, aus der Primärstruktur die Hydrophilität eines Proteins zu bestimmen. Diesem Programm liegt eine Skala zugrunde, in der die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften der Seitenketten der 20 Aminosäuren gewichtet sind. Bei globulären Proteinen fanden die Autoren, daß Sequenzabschnitte, in denen hydrophobe Aminosäuren überwiegen, laut kristallographischer Untersuchungen im Innern der gefalteten Proteine liegen. Umgekehrt konnte gezeigt werden, daß hydrophile Bereiche der Sequenz im gefalteten Protein außen zu liegen kommen.

Abb.15 zeigt das Hydropathie-Profil von Severin. Bei Severin findet man über die gesamte Sequenz verteilte hydrophile Regionen, wobei die carboxyterminale Region einen besonders ausgeprägten hydrophilen Charakter hat. Diese Befunde stehen im Einklang mit dem biochemischen Ergebnis, daß es sich bei Severin um ein lösliches Protein handelt.

Die hydrophoben Bereiche der Sequenz, vor allem bei Aminosäure 95, 120, 195 und 300, würden laut der oben erwähnten statistischen Aussagen den Teilen der Aminosäuresequenz entsprechen, die im Inneren des nativen Proteins liegen.

3.14. Homologien in der Aminosäuresequenz von Severin zu Sequenzen von funktionsähnlichen Proteinen anderer Organismen.

Die Severinsequenz wurde mit Hilfe verschiedener Programme der University of Wisconsin Computer Group (UWGCG) analysiert und mit in der Datei gespeicherten Aktinsequenzen und Sequenzen anderer Zytoskelettproteine verglichen. Severin zeigt keine signifikante Sequenzhomologie zu Aktin und unterscheidet sich in diesem Punkt nicht von den fragmentierenden Proteinen Gelsolin und Fragmin, bei denen ebenfalls keine signifikante Ähnlichkeit zum Aktinmolekül gefunden wurde. Das besondere Interesse galt dem Vergleich mit Sequenzen von anderen aktinbindenden Proteinen, die ähnlich wie Severin Aktinfilamente in Abhängigkeit von Calcium fragmentieren. Es handelt sich dabei um Fragmin aus *Physarum polycephalum*, sowie um Gelsolin und Villin, zwei Vertreter dieser Kategorie von aktinbindenden Proteinen bei Vertebraten. Bei diesen Vergleichen wurden zu den Sequenzen dieser drei Proteine ausgeprägte Homologien gefunden. Art und Umfang dieser Sequenzhomologien werden unter 4.1. ausführlich diskutiert. Die Homologie zwischen Severin und Fragmin, die aufgrund der hohen Ähnlichkeit dieser beiden Proteine sowohl hinsichtlich ihrer Funktion als auch der Molmasse von 40 kD, immer vermutet wurde, wird aus dem Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen nicht unbedingt ersichtlich (Tab.3). Severin und Fragmin unterscheiden sich hinsichtlich des Gehalts an den Aminosäuren mit ungeladener polarer Seitenkette Gly und Ser, sowie Ala und Val, zweier Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette, beträchtlich. Dahingegen ist der Gehalt an den hydrophoben Aminosäuren Met, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr und der basischen Aminosäure Lys ähnlich.

Tabelle 3: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Fragmin (Ampe und Vandekerckhove, 1987) und Severin

	Fragmin	Severin
Arg	14,9	10
Cys	-	5
Asx	37,0	35
Thr	18,4	22
Ser	21,2	35
Glx	46,8	35
Pro	15,8	15
Gly	40,2	28
Ala	35,9	26
Val	36,3	19
Met	2,7	1
Leu	36,8	31
Ile	17,2	20
Tyr	14,0	13
Phe	20,8	18
Lys	32,7	34
His	13,0	7

3.15. Charakterisierung der Severinmutante HG1132

Die Mutante wurde mit Hilfe der "Colony-Blot-Technik" unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 42-63-5 isoliert (Wallraff et al., 1985). Da die Mutante durch "Screening" mit nur einem monoklonalen Antikörper gefunden wurde, war nicht auszuschließen, daß in der Mutante ein voll funktionsfähiges Severin vorliegt, bei dem nur das vom verwendeten monoklonalen Antikörper erkannte Epitop verändert ist. Um Antikörper zu erhalten, die gegen möglichst viele Epitope des Severinmoleküls gerichtet sind, wurden polyklonale Seren und monoklonale Antikörper gegen Severin hergestellt. Wenn das mit verschiedenen Antikörpern getestete Zellmaterial von HG1132 im Immunoblot mit keinem der verwendeten Antikörper reagiert, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon

ausgegangen werden, daß die Mutante kein Severin exprimiert. Aus diesem Grunde wurde im Immunoblot Zellhomogenat der Mutante mit polyklonalen Antiseren und verschiedenen monoklonalen Antikörpern getestet. Zusätzlich zu diesem Nachweis der Abwesenheit von Severin wurden Proteinfractionen unterschiedlichen Reinigungsgrades aus HG1132-Zellen auf viskositätserniedrigende Aktivität untersucht. Da die Mutante HG1132 wie der *D.discoideum* Stamm AX2 in der Lage ist axenisch und in Schüttelkultur zu wachsen, war es möglich, das zur Isolierung von Severin aus AX2-Wildtypzellen ausgearbeitete Reinigungsschema anzuwenden. Dazu wurden Zellen der Mutante in 5 l Schüttelkulturen angezogen. Zusätzlich wurden im Viskositätstest Fraktionen der DE52-Säule untersucht, die bei AX2 kein Severin enthalten. In diesen Fraktionen sind beim Wildtyp die Aktivitäten der aktinbindenden Proteine "cap 32/34", α -Actinin, 120 kD-Protein, und "cap 100" nachweisbar. Durch dieses Vorgehen sollte es möglich sein, die Aktivität eines in seinen Bindungseigenschaften an die DEAE-Zellulose veränder-ten aber dennoch aktiven Severins zu finden. Außerdem kann hierdurch gezeigt werden, daß in der Mutante HG1132 die anderen aktinbindenden und viskositäts-beeinflussenden Proteine nicht verändert sind.

3.15.1. Immunologische Charakterisierung

Zellhomogenat von AX2 und HG1132 wurde elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Pro Gelspur wurden 1×10^6 Zelläquivalente aufgetragen, die etwa 100 μ g Protein entsprechen. Im Unterschied zu AX2 reagierte HG1132-Zellhomogenat im Immunoblot weder mit den polyklonalen Seren noch mit den monoklonalen Antikörpern (Abb.16).

Die polyklonalen Seren zeigten im Immunoblot mit Zellhomogenat von AX2 und HG1132 eine Reaktion mit einem Protein, das nach SDS-PAGE eine Bande im 55 kD Bereich bildet. Diese Reaktion wurde bei allen polyklonalen Seren gefunden, sowohl bei den Seren aus Kaninchen als auch bei denen aus Meerschweinchen.

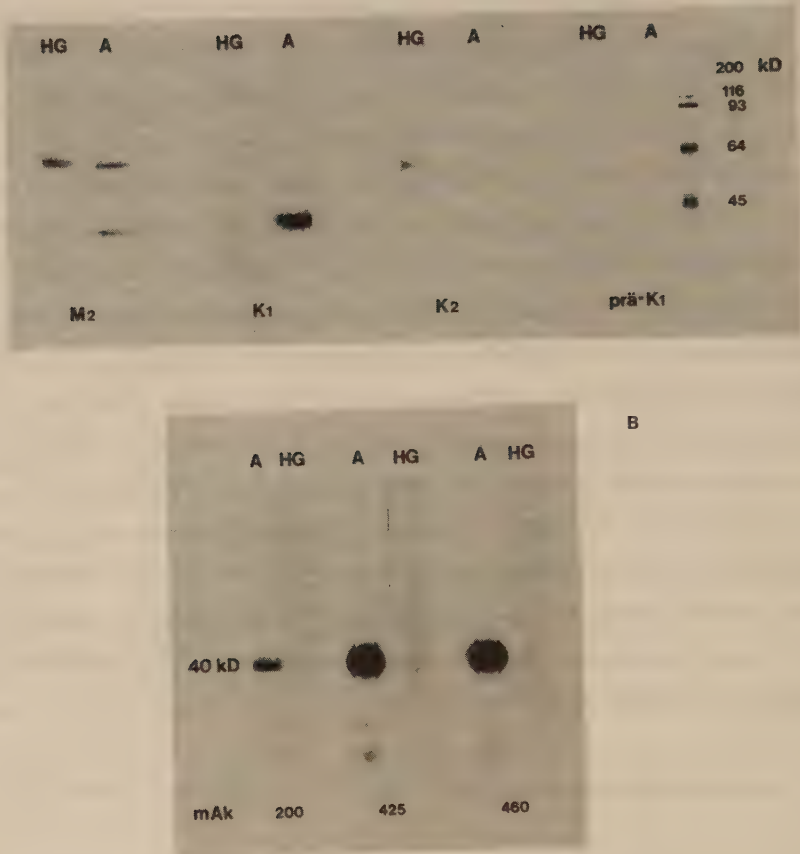


Abb.16: Immunoblots von to Zellhomogenat von AX2 und HG1132
 Die Proteine (1×10^6 Zelläquivalente, die etwa 100 μ g Protein entsprechen) wurden elektrophoretisch (10 % SDS-PAGE) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern inkubiert. A = Zellhomogenat von AX2, HG = Zellhomogenat von HG1132.
 A. Indirekte Markierung der polyklonalen Antiseren mit ^{125}J -markiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG.
 M2 = Antiserum von Meerschweinchen 2, K1 = Antiserum von Kaninchen 1, K2 = Antiserum von Kaninchen 2, prä-K1 = Prä-immunserum von Kaninchen 1;
 B. Direkte Markierung mit ^{125}J markierten monoklonalen Antikörpern. Die Nummern der Antikörper lauten: mAk 102-200-1, mAk 102-425-1 und mAk 101-460-2.

Das 55 kD Protein bindet im Gegensatz zu Severin an die DEAE-Säule und kann mit einem 0 - 0,3 M NaCl-Gradienten bei der gleichen Leitfähigkeit wie "cap32/34" eluiert werden.

Einige Punkte sprechen dafür, daß anti-Severin Antikörper mit diesem 55 kD Protein kreuzreagieren: 1. Im Präimmunserum ist diese Reaktivität nicht vorhanden. 2. Die Reaktivität ist sowohl in den Kaninchen-Antiseren als auch im Meerschweinchen-Immunserum nachweisbar. 3. Zum Immunisieren der Tiere wurden verschieden behandelte Proteinproben verwendet (s. 2.6.; zum Immunisieren von Kaninchen 1 wurde die Severin-Bande aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, die anderen Tiere wurden mit gereinigtem, in Puffer gelöstem Severin immunisiert;). 4. Beim "Screening" einer HG1132 Genbank (s. 2.26.) unter weniger stringenten Bedingungen wurde ein genomischer Klon gefunden, bei dem es sich nicht um einen Severin-Klon handelt. (Nach Subklonierung in pUC19 wurde die DNA mit Hilfe der zur Sequenzierung der Severin-cDNA-Fragmente synthetisierten Oligonukleotide, sowie reverse- und uniprimer sequenziert. Da die Severin-spezifischen Oligonukleotide nicht zu dem DNA-Fragment hybridisierten, und auch die mit uni- und reverseprimer bestimmte Sequenz keine Homologie zur Severinsequenz aufweist, kann es sich bei diesem genomischen Klon nicht um einen Severin-Klon handeln. Er könnte jedoch das Gen für das "kreuzreagierende" Protein enthalten.)

3.15.2. Biochemische Charakterisierung

Als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung dienten 5,4 l Zellkultur der Mutante HG1132. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml geerntet. Man erhielt etwa 40 g gepackte Zellen. Die Zellen wurden in der Parrbombe aufgeschlossen. Membranen der lysierten Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g drei Stunden zentrifugiert. Das lösliche Material wurde auf eine DEAE-Säule gegeben.

Im Durchfluß der DEAE-Säule (100 ml), in dem sich bei der Aufreinigung von AX2-Zellen Severin befindet, wurde bei der Proteinaufreinigung des Mutanten-Zellmaterials keine Ca^{2+} -abhängige viskositätserniedrigende Aktivität gefunden. Tab.4 zeigt dieses Ergebnis.

Ein Aliquot (5 μl) des DEAE-Durchflusses (100 ml) wurde im Viskositätstest getestet. Die AX2-Probe wurde aus versuchsbedingten Gründen 1:3 verdünnt (die von der Stahlkugel zur Zurrücklegung der Teststrecke benötigte Zeit war wegen ihrer Kürze nicht meßbar). Der Test wurde sowohl in Anwesenheit von 200 μM Ca^{2+} als auch in 1 mM EGTA durchgeführt.

Die Aktin-Polymerisation wurde durch die AX2-Probe sowohl mit Ca^{2+} als auch mit EGTA stark reduziert. In Anwesenheit von Ca^{2+} betrug die relative Viskosität der Aktinlösung 3,0% (Experiment 1) und 3,8% (Experiment 2). In Anwesenheit von EGTA war die relative Viskosität deutlich höher. Sie betrug 14,9% (1) und 13,5% (2). Dieser Unterschied beruht darauf, daß die fragmentierende Aktivität von Severin Calcium-abhängig ist. Eine möglich Erklärung für die ebenfalls starke Erniedrigung der Aktin-Polymerisation durch die AX2-Probe in Anwesenheit von EGTA wäre, daß im Durchfluß die viskositätserniedrigende Aktivität von "cap 32/34" nachweisbar ist, da dieses Protein bei den gewählten Bedingungen nicht vollständig an die DEAE-Säule gebunden wird.

Die HG1132-Probe zeigte weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Calcium einen Einfluß auf die Aktinpolymerisation. Die relative Viskosität der Lösung lag bei $\geq 90\%$.

Tabelle 4: Einfluß des DEAE-Durchflusses auf die Viskosität einer F-Aktinlösung:

Vergleich zwischen AX2 und HG1132

	AX2-Durchfluß		HG1132-Durchfluß	
	200 µM Ca ²⁺	1 mM EGTA	200 µM Ca ²⁺	1 mM EGTA
(1)	4 %	15 %	95 %	96 %
(2)	3 %	14 %	90 %	95 %

Pro Test wurden 5 µl des DEAE-Durchflusses (100 ml) eingesetzt. Die AX2-Probe wurde 1:3 verdünnt. Im AX2-Durchfluß ist die Ca²⁺-abhängige Aktivität von Severin deutlich nachweisbar. Durch den HG1132-Durchfluß wird die Viskosität der F-Aktinlösung nicht reduziert.

Die viskositätserniedrigenden Aktivitäten der gebundenen und mit NaCl eluierten Proteine sind den bekannten, für AX2 beschriebenen aktinbindenden Proteinen "cap32/34" (Schleicher et al., 1984) und "cap 100" (M.Schleicher, unveröffentlichtes Ergebnis) zuzuordnen. Die Severin-Aktivität tritt also auch in den eluierten DEAE-Fraktionen nicht auf (Abb.18).

Auch die viskositätserhöhenden Aktivitäten von α-Actinin und des 120 kD-Proteins sind in den DEAE-Fraktionen der HG1132 Proteinaufreinigung nachweisbar. Die Elution dieser beiden Proteine von der DEAE-Säule erfolgte bei einer Leitfähigkeit von 10 bis 15 mS (Abb.17).

Aliquots der DEAE-Fraktionen (2 µl) wurden auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Gemisch der monoklonalen anti-Severin Antikörper inkubiert. Auf den Autoradiogrammen ist keine Bande bei 40 kD sichtbar. Dieselbe Nitrozellulose wurde anschließend mit einem gegen "cap32/34" gerichteten Antikörper inkubiert. Im Autoradiogramm ist eine 34 kD-Bande markiert (Abb.18).

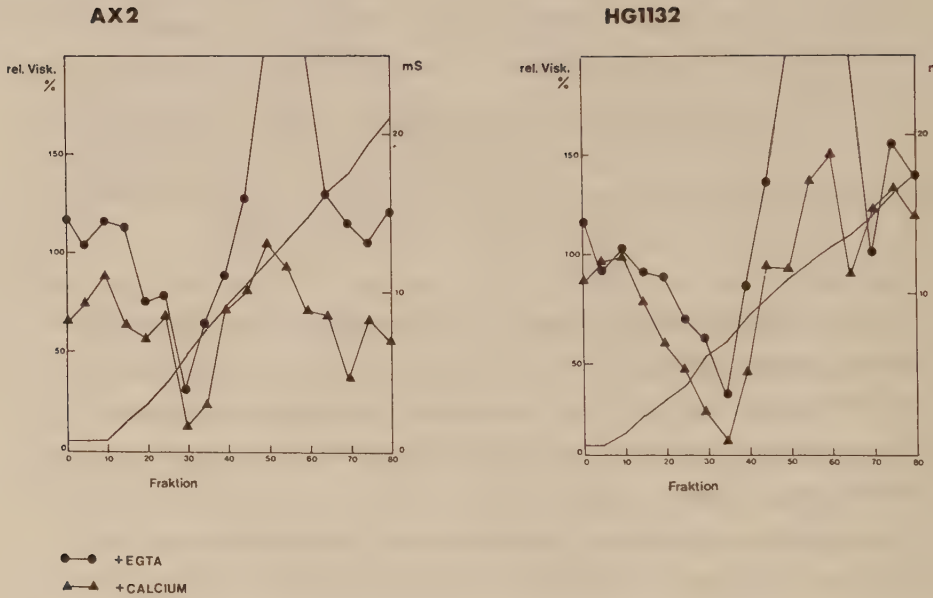


Abb.17: Chromatographie der löslichen Fraktionen des Zellhomogenats auf der DEAE-Zellulose-Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 - 0,4 M NaCl): Vergleich zwischen AX2 und HG1132. Bei einer Leitfähigkeit von etwa 6 bis 7 mS wird in beiden Fällen "cap 32/34" eluiert. Die Elution von α -Aktinin erfolgt bei 10 bis 12 mS. Pro Fraktion (3,5 ml) wurden 5 μ l im Viskositätstest (Gesamtvolumen 160 μ l) eingesetzt. Die Zeit, die die Stahlkugel benötigt um in einer Aktinlösung, die anstelle der zu testenden Proteinlösung Puffer oder aqua dest. enthält, eine definierte Strecke zurückzulegen wird 100 % rel. Viskosität gleichgesetzt (s.2.3.).

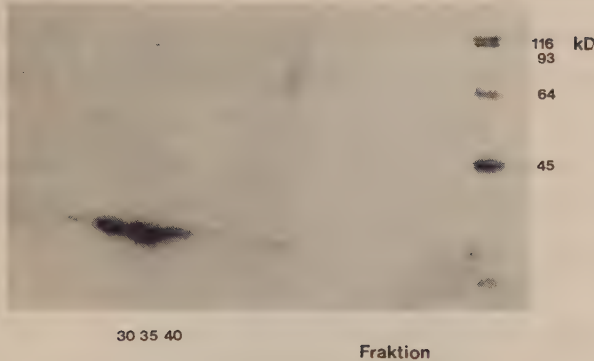


Abb.18: Immunoblot der DEAE-Fractionen von HG1132.

Von jeder fünften Fraktion wurden 2 µl auf einem SDS-Gel (10 % Polyacrylymid) elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Gemisch der monoklonalen Antikörper mAK 101-211-1, 101-460-2, 102-425-1 und 102-460-1 inkubiert. Die Antikörper waren mit ^{125}I markiert.

Im Autoradiogramm wurde keine Bande von 40 kD (Severin) sichtbar. Dieselbe Nitrozellulose wurde mit dem gegen "cap 32/34" gerichteten Antikörper mAK 43-442-1 inkubiert. In den Fraktionen, in denen viskositätserniedrigende Aktivität nachgewiesen worden war, wurde durch die Antikörper eine 34 kD-Bande markiert.

DF = Durchfluß

Um Proteine abzutrennen, die eventuell die Aktivität von Severin dadurch verdecken, daß sie eine viskositäts erhöhende Aktivität besitzen, wurde mit dem DEAE-Durchfluß eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Severin fällt mit 60 - 80% Ammoniumsulfatsättigung. Sowohl das 0 - 60% Ammoniumsulfat-Präzipitat als auch das 60 - 80% Ammoniumsulfat-Präzipitat wurden in 5 ml MEDA-Puffer aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Verschiedene Mengen dieser Proben wurden auf viskositäts erniedrigende Eigenschaften getestet und anschließend im Viskositätstest eingesetzt. Alle AX2-Proben

zeigten eine viskositätserniedrigende Aktivität. Die geringe Aktivität des 0 - 60 % Ammoniumsulfat-Präzipitat ist auf Spuren von Severin zurückzuführen, die bereits bei dieser Ammoniumsulfat-Konzentration gefällt wurden. Durch keine der HG1132-Proben wurde die Viskosität einer F-Aktinlösung signifikant erniedrigt. Die relative Viskosität der Aktinlösung war bei allen Konzentrationen $\geq 85\%$. Zwischen dem 0 - 60% Ammoniumsulfat-Präzipitat und dem 60-80 % Ammoniumsulfat-Präzipitat bestand hinsichtlich der Wirkung auf den Polymerisationszustand der Aktinlösung kein Unterschied.

3.15.3. Molekularbiologische Charakterisierung der Mutante

3.15.3.1. Untersuchung zum Restriktionspolymorphismus zwischen HG1132 und AX2

Genomische DNA von AX2- und HG1132-Zellen wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und zum nicktranslatierten EcoRI-Fragment aus *cDS1* hybridisiert. Es wurden die Restriktionsenzyme EcoRI, HindIII, Sau3aI, DraI, BglII, PvuI, AccI, HpaI, RsaI, ClaI, AluI und MboII verwendet.

Bei der mit MboII geschnittenen HG1132-DNA war die bei AX2-DNA und bei DNA vom Wildtyp-Stamm NC4 vorhandene hybridisierende Bande von 1,5 kB auf dem Autoradiogramm nicht sichtbar (Abb.19). Stattdessen fand man eine hybridisierende Bande bei 0,8 kB. Die Bande bei 0,5 kB leuchtete sowohl bei AX2 und HG1132 DNA auf. Das 0,5 kB-Fragment ergab im Autoradiogramm nur eine schwache Markierung. Eine Erklärung hierfür ist, daß beim Transfer auf Nitrozellulose kleine Fragmente ($\leq 0,6$ kB) nicht effizient gebunden werden. Der Grund könnte aber auch sein, daß *cDS1* mit dem großen Fragment einen längeren Bereich gemeinsam hat und folglich stärker hybridisiert.

Der im genomischen Southern Blot für MboII-verdaute AX2- und HG1132-DNA gefundene Unterschied weist darauf hin, daß die Mutante einen Defekt im

Severin-Strukturgen hat.

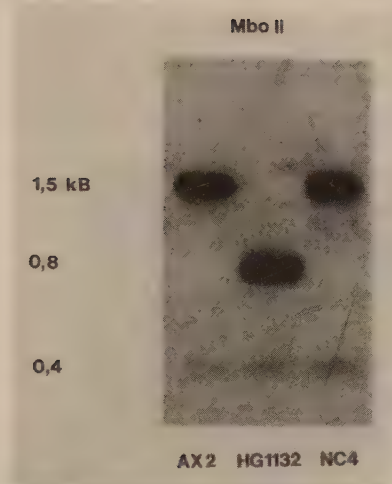


Abb.19: Nachweis eines Restriktionspolymorphismus für MboII. Genomische DNA von AX2, HG1132 und NC4 wurde mit dem Restriktionsenzym MboII verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt (1 % Agarose), an Nitrozellulose gebunden und mit α -³²P-markierter cDS1-DNA hybridisiert.

3.15.3.2. Vergleich von Severin-Gen-Transkripten aus AX2 und HG1132.

Die auf Nitrozellulose transferierte Gesamt-RNA von vegetativen AX2- und HG1132-Zellen wurde mit dem nicktranslatierten EcoRI-Fragment aus cDS1 hybridisiert (Abb.20). Bei AX2 wurde dadurch eine 1,4 kB RNA markiert, bei der Mutante ein um etwa 100 Basenpaare größeres Transkript. Die im Autoradiogramm sichtbaren Banden von AX2- und HG1132-RNA unterscheiden sich auch in ihrer Intensität. Obwohl jeweils 10 µg Gesamt-RNA pro Gelspur aufgetragen wurden, war die Markierung des Mutanten-Transkripts deutlich schwächer. Zur Kontrolle

wurde das gleiche Nitrozellulosefilter mit einem nicktranslatierten Fragment des für das 120 kD Protein kodierenden Gens hybridisiert: Bei AX2 und HG1132 leuchteten im Autoradiogramm zwei gleich große und fast gleich stark markierte Banden auf.

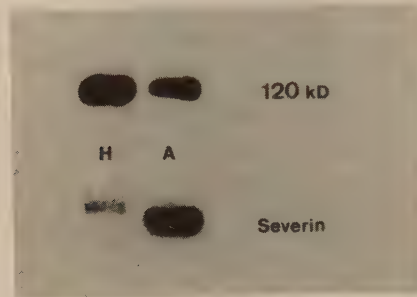


Abb.20: Nachweis eines um 100 Basenpaare vergrößerten Transkripts bei der Mutante HG1132.
An Nitrozellulose gebundene RNA von AX2 und HG1132 t_0 -Zellen wurde mit nicktranslatierten, für Severin und das 120 kD Protein spezifischen cDNA-Fragmenten hybridisiert.

3.15.3.3. Untersuchung zur Entwicklungsregulation des Severin-Gen-Transkripts in der Mutante

10 μ g Gesamt-RNA aller Entwicklungsstadien von *D.discoideum* AX2 und HG1132 wurde auf Nitrozellulose transferiert und mit dem nicktranslatierten 0,9 kB EcoRI-Fragment aus λ cDS1 hybridisiert (Abb.21). Das Autoradiogramm zeigt einen Anstieg der Menge an Severin-Transkript mit Beginn der Hungerphase, die ihr Maximum zu Beginn der Aggregation (t_0) erreicht. Der RNA-Gehalt nimmt dann deutlich ab, doch kann die RNA bis zum Stadium der Fruchtkörperbildung nachgewiesen werden. Dies ist bei Mutante und Wildtyp der Fall.

Dieselben Nitrozellulosefilter wurden anschließend mit einem nicktranslatierten Fragment des für das 120 kD-Protein kodierenden Gens hybridisiert. Die mRNA dieses Gens wird unterschiedlich zur Severin-mRNA reguliert (Abb.21); es wird keine so deutliche Zunahme des Transkripts bis zu t_9 sichtbar. Wie schon unter 3.15.3.2. erwähnt, ist im Northern-Blot bei der Mutante weniger Transkript nachweisbar als beim Wildtyp. Dies gilt vor allem für die Entwicklungsstadien t_0 bis t_6 und t_{12} bis t_{18} .

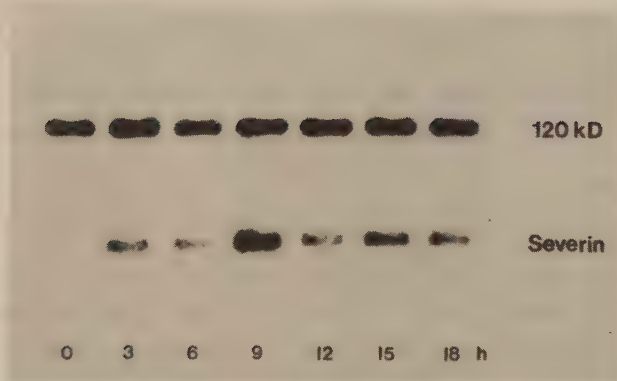


Abb.21: Nachweis des Severin-Transkripts während der Entwicklung der HG1132-Mutante
Filtergebundene RNA verschiedener Entwicklungsstadien (t_0 bis t_{18}) wurde mit nicktranslatierter cDS1-DNA hybridisiert. Dasselbe Filter wurde mit einem α - ^{32}P markierten, für das 120 kD-Protein kodierenden cDNA-Fragment hybridisiert.

3.15.4. Zellbiologische Untersuchung der Mutante HG1132

Die Mutante HG1132 wächst sowohl auf Bakterien als auch axenisch und sowohl auf Platte als auch in Schüttelkultur. Die Fähigkeit auf Bakterien zu wachsen spricht für eine intakte Phagozytose, die Fähigkeit axenisch zu wachsen belegt die Fähigkeit zur Pinozytose. Die Generationszeit von HG1132 Zellen in Schüttelkultur bei 23°C beträgt wie beim Wildtyp etwa acht Stunden (E. Wallraff, persönliche Mitteilung). In ihrer späten Entwicklung zeigt die Mutante HG1132 eine normale Fruchtkörper- und Sporenbildung. Auf Grund einer von E. Wallraff für HG1132 durchgeführten genetischen Analyse kann das Severin-Gen auf Chromosom 7 lokalisiert werden.

3.15.4.1. Lichtstreuungsmessungen

Mit den Lichtstreuungsmessungen kann die Reaktion aggregationskompetenter Zellen auf den chemoattraktiven Faktor cAMP untersucht werden. Für aggregationskompetente Zellen stellt cAMP einen Reiz dar, auf den die Zellen mit einer positiven Chemotaxis reagieren. Die Bewegung der Zellen auf die cAMP-Quelle hin ist mit einer Zellformveränderung verbunden. Formveränderung und Zellbewegung sind Prozesse, für die eine Beteiligung des Aktinsystems angenommen wird. Wenn die Mitwirkung des Severins für diese Vorgänge essentiell wäre, müßten sich auch die Lichtstreuungsänderungen nach cAMP-Gabe bei Wildtyp und Mutante unterscheiden.

Abb.22 zeigt das Versuchsergebnis. Wird von außen kein cAMP zugefügt, so treten bei HG1132 die auch beim Wildtyp beobachteten Oszillationen der Lichtstreuung auf. Bei einer cAMP-Konzentration von 10^{-9} M cAMP tritt noch keine messbare Lichtstreuungsänderung auf. Bei den anderen getesteten cAMP-Konzentrationen, 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M, mißt man Lichtstreuungsänderungen der Zellsuspension, die denen der AX2-Zellen vergleichbar sind.

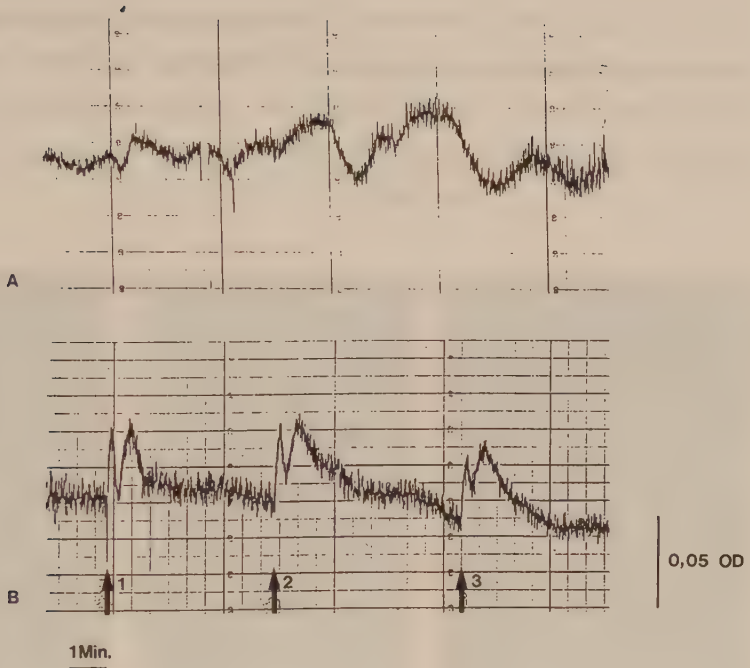


Abb.22: Lichtstreuungsmessungen an aggregationskompetenten HG1132-Zellen.
A: Spontane Änderungen der Lichtstreuung
B: Änderungen der optischen Dichte nach Zugabe von cAMP.
1= 1×10^{-8} M cAMP; 2= 1×10^{-7} M cAMP; 3= 1×10^{-6} M cAMP.
Unmittelbar nach Zugabe von cAMP ist die für AX2-Zellen beschriebene (Gerisch und Hess, 1974) schnelle Antwort meßbar, der die für t_6 -Zellen beschriebene langsame Antwort.
OD=500.

3.15.4.2. Chemotaxis

Während der chemotaktischen Bewegung zu einem Aggregationszentrum hin strecken sich aggregierende Wildtyp-Zellen von *D.discoideum* und bilden Stränge durch Zell-Zell-Adhäsion. Bereits 5 Minuten nach Anbringen der cAMP-Quelle waren die ersten Strangbildungen zu beobachten. Die Zellen bewegten sich auf

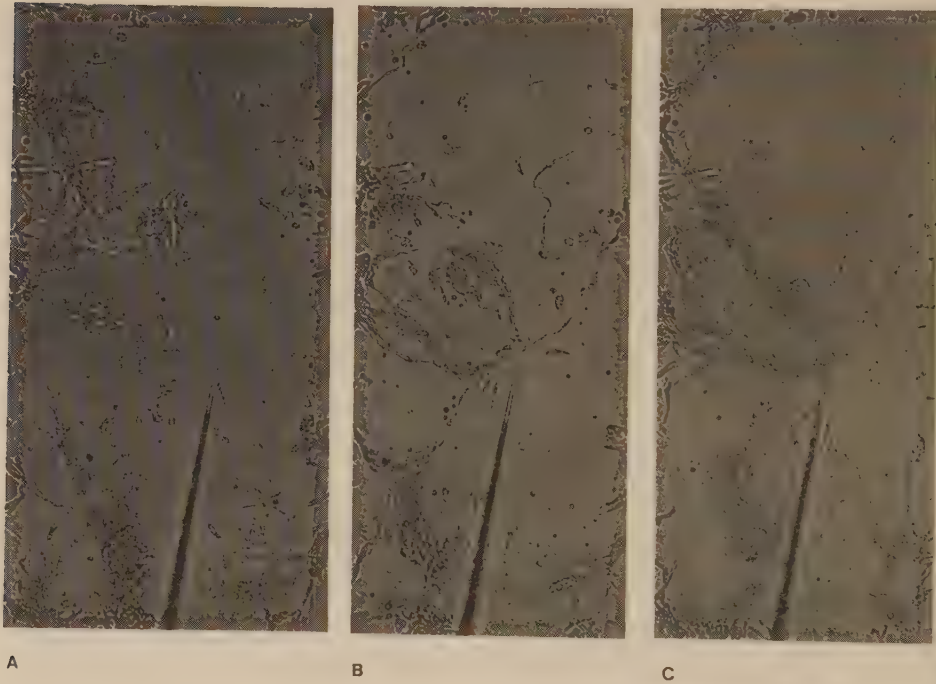


Abb.23: Chemotaxis von HG1132-Zellen
 t_0 -Zellen wurden auf eine Petrischale mit Teflon-Boden gegeben und mit einer 1 mM cAMP enthaltenden Mikropipette stimuliert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Einsetzen der Mikropipette photographiert. A: unmittelbar nach Einsetzen der Pipette; B: 15 Minuten später; C: 30 Minuten später

die Mikropipette zu (Abb.23). Als Kontrolle wurde gleichzeitig ein Experiment mit AX2 t_6 -Zellen gestartet. Nach etwa 5 Minuten war eine Bewegung der AX2-Zellen zur cAMP-Quelle sichtbar. Das Ergebnis zeigt, daß sich die Mutante HG1132 in ihrem durch den cAMP-Reiz ausgelösten Verhalten nicht vom Wildtyp unterscheidet.

3.15.4.3. Quantitative Analyse von Motilität und Chemotaxis

Die Zellmotilität und Chemotaxis von aggregationskompetenten (t_6) AX2- und HG1132-Zellen wurde mit der unter 2.25.3. beschriebenen Methode untersucht. Zunächst wurde das Verhalten der Zellen in Phosphatpuffer ohne cAMP Gradient beobachtet. Während der ersten 30 Minuten in der Versuchskammer wurde ein Anstieg der Geschwindigkeit der Zellen sichtbar (Tab.5). Die durchschnittliche Wendehäufigkeit (T) der beobachteten AX2- und HG1132-Zellen lag bei etwa 1 rad^2/min . Nach Anlegen des cAMP Gradienten nahm die Wendehäufigkeit ab und die Geschwindigkeit der Amöben leicht zu. Die Bewegung der Zellen war auf den Gradienten zu gerichtet (die Orientierung nimmt zu). Dieses Verhalten war während der ersten Stunde nach Anlegen des Gradienten zu beobachten. Nach etwa eineinhalb Stunden wurde eine leichte Abnahme der Geschwindigkeit und eine Zunahme der Wendehäufigkeit (T) messbar.

Der Vergleich zwischen AX2 und HG1132 Zellen zeigte weder eine reduzierte Motilität noch eine gestörte Chemotaxis bei der Mutante HG1132.

zu Tab.5: Mit HG1132 Amöben wurden zwei Experimente durchgeführt. Die Parameter wurden für sechs Umläufe á 30 Minuten berechnet. Die Anzahl der Zellen (N), deren Verhalten pro Experiment untersucht wurde lag zwischen 34 und 142 Zellen. Die Geschwindigkeit (V) beschreibt die Bewegung des Zellzentrums. μ ist der Unterschied in Grad zwischen der mittleren Bewegungsrichtung des Zellzentrums und der Richtung des Gradienten. Die Wenedehäufigkeit (T) beschreibt die Richtungsänderung pro Zeit für alle Zellen mit einer Geschwindigkeit von mindestens $2,9 \mu\text{m}/\text{Min.}$ und wird berechnet als Koeffizient der Rotationsdiffusion. Die Orientierung beschreibt die Genauigkeit der Chemotaxis für alle Zellen mit einer Geschwindigkeit von $2,9 \mu\text{m}/\text{Min.}$; sie wird berechnet als der Teil der Zellbewegung in Richtung des Gradienten (immer 1 oder weniger).

Tabelle 5: Motilität aggregationskompetenter Dictyostelium Zellen:

Vergleich AX2 mit HG1132

	V (µm/min)	µ	T (rad ² /min)	N	Orientierung
ohne cAMP:					
t30					
HG1132 (1)	3,5 ±2,5	-17	1,0	49	0,10
HG1132 (2)	3,4 ±4,4	201	1,12	104	-0,20
AX2	2,9 ±3,3	42	1,03	34	0,03
t60					
HG1132 (1)	7,2 ±4,4	-11	1,16	50	0,01
HG1132 (2)	9,3 ±5,7	228	1,03	130	-0,06
AX2	7,2 ±5,8	48	0,81	39	0,16
mit cAMP:					
t30					
HG1132 (1)	8,6 ±4,8	-21	0,79	59	0,25
HG1132 (2)	10,6 ±5,6	-58	0,88	142	0,03
AX2	10,5 ±6,1	-4	0,60	45	0,43
t60					
HG1132 (1)	10,3	4	0,79	n.b.	0,32
HG1132 (2)	13,9 ±6,4	-10	0,86	127	0,46
AX2	10,6 ±5,8	-2	0,93	83	0,27
t90					
HG1132 (1)	8,2 ±4,7	5	1,44	52	0,12
HG1132 (2)	12,4 ±6,8	2	0,89	110	0,41
AX2	8,8 ±5,0	18	1,36	60	0,17
t120					
HG1132 (1)	7,5 ±5,4	16	1,94	59	0,11
HG1132 (2)	11,2 ±5,9	-8	1,23	99	0,25
AX2	8,8 ±5,8	9	1,34	63	0,19

4. Diskussion

4.1. Severin zeigt Sequenzhomologien zu anderen F-Aktin-fragmentierenden Proteinen

Der Sequenzvergleich von Proteinen mit verwandter Funktion ist ein Weg, funktionelle Domänen in der Proteinstruktur zu identifizieren.

4.1.1. Sequenzhomologie zwischen Severin und Gelsolin

Gelsolin ist ein Calcium-abhängiges aktinbindendes Protein mit einer Molmasse von 90 kD, das zuerst aus Kaninchen-Makrophagen isoliert wurde (Yin und Stossel, 1979). Später konnte Gelsolin in vielen Säugetierzellen, u.a. auch in Muskelzellen nachgewiesen werden (Lind et al., 1982; Wang und Bryan, 1981; Yin et al., 1981; Petrucci et al., 1983; Rouayrerenc et al., 1984; Hinssen et al., 1984; Kobayashi et al., 1983). Aus menschlichem Blutplasma konnte ein funktionell ähnliches Protein mit einem etwas größeren Molekulargewicht (93 kD) isoliert werden (Smith et al., 1984; Yin et al., 1984). In Anwesenheit von Calcium bildet Gelsolin mit G-Aktin-Molekülen einen Komplex (2 : 1 Aktin-Gelsolin-Komplex). Gibt man Gelsolin zu einer F-Aktinlösung, so werden die Aktinfilamente gekürzt. Dies geschieht durch Fragmentierung von Aktin-Aktinbindungen des Aktinfilaments und durch die Bindung von Gelsolin an das schnellwachsende Ende des Aktinfilaments. Nur eines der beiden G-Aktin-Moleküle des Gelsolin-Aktin-Komplexes dissoziiert nach Erniedrigung der Calciumkonzentration nach Zugabe von EGTA. Die Bindung des zweiten Aktinmoleküls ist Calcium-unabhängig. Im Gegensatz zu freiem Gelsolin ist dieser Komplex nicht in der Lage, Aktinfilamente zu fragmentieren (s.o.), wohingegen das schnellwachsende Ende des Aktinfilaments durch den Komplex blockiert werden kann (Kurth et al., 1983; Janmey et al., 1985). Die vollständige cDNA-Sequenz von Gelsolin wurde von Kwiatkowski et al. (1986)

veröffentlicht. Gelsolin weist eine repetitive Struktur auf. Aminosäurefolgen des aminoterminalen Teils des Moleküls (AS 42 bis AS 371) sind im carboxyterminalen Teil (AS 421 bis AS 735) dupliziert. Dieser Aufbau spiegelt sich auch in der Funktion der erwähnten Regionen wieder: Sowohl in der N-terminalen Hälfte als auch in der C-terminalen Hälfte des Proteins wurden aktinbindende Funktionen lokalisiert, indem man proteolytische Fragmente des Gelsolins auf Aktivität testete (Kwiatkowski et al., 1985; Bryan und Hwo, 1986; Chaponnier et al., 1986). Allerdings unterscheiden sich die Aktivitäten der beiden Fragmente bezüglich ihrer Regulation. Das aminoterminal Fragment zeigt eine Calcium-unabhängige Aktin-fragmentierende Aktivität. Das carboxyterminale Fragment weist keine Schneideaktivität auf, die Aktinbindung ist jedoch Calcium-abhängig. Beim Vergleich der Sequenzen von Severin und von Gelsolin findet man eine starke Homologie zwischen den Aminosäuren 40 bis 351 von Severin und den Aminosäuren 63 bis 383 von Gelsolin (Abb.24). Wegen der repetitiven Struktur von Gelsolin findet man auch eine Homologie zwischen Severin und dem carboxyterminalen Teil des Moleküls (Aminosäuren 44 bis 353 von Severin und Aminosäuren 445 bis 756 von Gelsolin) (Abb.24).

zu Abb.24: Dot plot Analyse der Severin/Gelsolin Homologie.
Der Vergleich wurde mit Hilfe der Computerprogramme COMPARE und DOTPLOT der University of Wisconsin Computer Group (UWGCG) durchgeführt.
Die Achsen stellen die Sequenznummern der Aminosäuren dar. Homologe Bereiche sind als Diagonalen dargestellt.

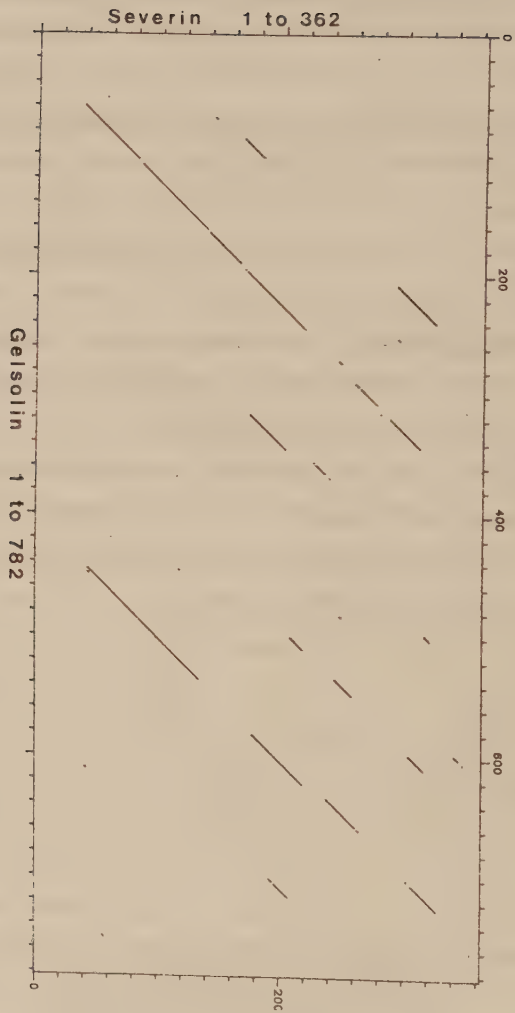


Abb. 24

4.1.2. Sequenzvergleich zwischen Severin und Villin

Das aktinbindende Protein Villin kann aus den Mikrovilli des Dünndarms isoliert werden (Bretscher und Weber, 1980; Glenney et al., 1980; Mooseker et al., 1980). Die Molmasse von Villin beträgt 95 kD. Bei Villin konnte außer der "fragmenting und capping activity", die der von Gelsolin vergleichbar ist, eine sogenannte "bundling activity" nachgewiesen werden (Glenney und Weber, 1981; Matsudaira und Burgess, 1982). Liegt die Ca^{2+} -Konzentration unter 10^{-6} M so ist Villin in der Lage, Aktinfilamente miteinander zu verknüpfen. Die F-Aktin Schneideaktivität ist bei Ca^{2+} -Konzentrationen von $5 - 10 \times 10^{-6}$ M nachweisbar.

Beim Sequenzvergleich von Villin und Gelsolin wurde in der Region, der man die Schneideaktivität des Villinmoleküls zuordnet (Matsudeira et al., 1985), eine beachtliche Homologie zu Gelsolin gefunden. Es handelt sich dabei um die gleiche Region, die die Homologie zwischen Gelsolin und Severin umfaßt.

Der direkte Sequenzvergleich zwischen Villin und Severin zeigt, daß die Homologie zwischen diesen beiden Proteinen stärker ausgeprägt ist als die Homologie zwischen Gelsolin und Villin (Abb.25). In einer Folge von 16 Aminosäuren finden wir beim Vergleich zwischen Severin und Villin 11 identische Aminosäuren, während in der gleichen Folge nur 9 identische Aminosäuren im Vergleich mit Gelsolin zu finden sind.

zu Abb.25: Sequenzvergleich zwischen Gelsolin, Villin und Severin. N-terminale (Aminosäuren 1 bis 391) und C-terminale Hälfte des Gelsolin-Moleküls wurden mit der gesamten Severin-Sequenz verglichen. Die veröffentlichte Sequenz eines Villin-Peptids wurde ebenfalls mit der Severin-Sequenz verglichen. Es wurde das Programm PIRALIGN angewendet. Identische Aminosäuren sind durch den Buchstaben , homologe Aminosäuren durch einen vertikalen Strich gekennzeichnet. Als homologe Gruppen gelten D, E, Q, N; F, Y, W; I, L, V, M; S, T, A, G und H, R, K. Die Gelsolin, Villin und Severin gemeinsame homologe Region ist unterstrichen.

GELSOLIN	1	MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRAATASRGASQAGAPQGRVPEARPNSMVVE	55
SEVERIN	1	M I K N R ----- L G R A	34
GELSOLIN	56	HPEFLKAGKEPGLQIWRVEKFDLPVPPTNLYGDEFTGDAYVILKTQVLRNGN-LQ	109
SEVERIN	35	--QWKGVGQAPGLKIWRIENFKVVPVPESSYKGFDGDSYIILHT--FKEGNSLK	85
VILLIN-44T	16	PGI QI WRIENMEMVPV	31
GELSOLIN	110	YDLHYWLGNECSQDESGAAAIFTVLQDDYLNGRAVHQREVQGFESATFLGYFKSG	164
SEVERIN	86	D H LG QDE G AA TV LDD L G Q R Q ES FL F	138
GELSOLIN	165	LKY--KKGGVASGFKHVPNEVVQRLFQVKGRRVVRATEVPVSWESFNNGDCFI	217
SEVERIN	139	---KYFILSGGVESGFNHVKPTEYK-PRLLHISGDKNAKVAEVLATSSLNSGDCFL	191
GELSOLIN	218	LDLGNNIHQWCGSNSRNERLKAQVSKGIRDNERSGRARVHV-SEEGTE-PEAM	270
SEVERIN	192	LDG I Q GS S E KA V I I D ER G V V E P	245
GELSOLIN	271	LQVLGPKPALPAGTEDTAKEDAANRKLAK-LYKVBNGAGTMSVSLVADENPFAQG	324
SEVERIN	246	WKLGLGGKGAIAA-----KHETAPTKEKVLKSLSDASGLKFEVSRGK-INKS	293
GELSOLIN	325	ALKSEDCFILDHGKDGKIFVWKGQANTEERKAALKTASDVITEM---DYPKQTQ	376
SEVERIN	294	SLKSEDDVFIIDLGN---IYTWIGSKSSPNEKKTAFSHATQYLVNNKRCYET--PI	344
GELSOLIN	377	VSVLPEGGETP---LFGQ	391
SEVERIN	345	V VL G L	362

GELSOLIN	392	FFKNWRDPDQTDGLGLSYLSSHIANVERVPFDDA-TLHTSTAMAAHQHMDDDGTG	445
SEVERIN	1	M I K N R K ----- L S A D L A G G	44
VILLIN-44T	16	PG	17
GELSOLIN	446	QKQIWRIEGSNKVPDPATYQGQFYGGDSYIILYNRYRHGGRQGQIYNWQGAQSTQ	500
SEVERIN	45	LK-IWRIENFKVVPVPESSYKGFDGDSYIILHTFKEGNSLKHDHIFLGTFTTQ	98
VILLIN-44T	18	I-QIWRIENMEMVPV	31
GELSOLIN	501	DEVAASAILTAQLDEELGGTPVQSRVVQKGEPAHMLSLFGGKPM-IYKGGTSRE	554
SEVERIN	99	DEAGTAAYKTVELDDFLGGAPIQYRQCQSYESPSFSLF---PKYFILSGGVESG	150
GELSOLIN	555	GGQTAPAS--TRLFQVRANSAGATRAVEVLKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLVWG	607
SEVERIN	151	FNHVKPTKYPRLLHISGDKNA--KVAEVLATSSLNSGDCFLDLRGLTIYQFNG	203
GELSOLIN	608	TGASEAEKTAQELLRLVLAQP-----VQV---AEGSEPDGFWEALGGKAAY---	651
SEVERIN	204	SKSSPQEKNAAEVARAIDAERKGLPKVEVFCETSDIPAEFWKLGGKGAIAAK	258
GELSOLIN	652	RTSPRLKDKKMDAHPRLFACSNKIGRFVIEVP-GELMQEDLATDDVMLLDTW	705
SEVERIN	259	HETAPTKEKV-----LYKLSASGSLKFSEVSRGKINKSSLKSEDVFIIDLGN	307
GELSOLIN	706	QVFVWVGKDSQEEEEKTEALTSAKRYIETDPANRRRTPTIT-VVKQGFEPSPFVGW	759
SEVERIN	308	EIYTWIGSKSSPNEKKTAFSHATQYLVNN--KRCEYTPIVRVLENG-TNQSF---	356
GELSOLIN	760	FLGWDDDYWSVDPLDRAMAELAA	782
SEVERIN	357	-----ETL-----LSA	362

4.1.3. Sequenzvergleich zwischen Severin und Fragmin

Das aus *Physarum polycephalum* isolierte Protein Fragmin (Hasegawa et al., 1980; Hinssen, 1981) ist Severin bezüglich Funktion und Molmasse sehr ähnlich.

Fragmin bindet sowohl an G-Aktin als auch an das schnell wachsende Ende des Aktinfilaments. Die Bindung von Fragmin an Aktin, und somit auch die Fragmentierung des Aktinfilaments ist Calcium-abhängig.

Die veröffentlichte Aminosäuresequenz von Fragmin (Ampe und Vandekerckhove, 1987), mit der die Severinsequenz verglichen werden konnte, umfaßt 88% der vollständigen Fragminsequenz.

Der Sequenzvergleich zwischen Fragmin und Severin zeigt eine ausgeprägte Homologie von etwa 45 %, die sich über die ganze Länge der Moleküle erstreckt. Die Aminosäuren 95 bis 114 von Severin und 63 bis 82 von Fragmin, das sind 19 Aminosäuren, sind identisch (Abb. 26).

In der Fragminsequenz liegt ein dreimal wiederholtes Motiv vor, das den 3., 4. und 5. Tryptophanrest des Moleküls umgibt. Es lautet:

Val x x Try x Gly x x x x x Glu x x x Ala (Ampe und Vandekerckhove, 1987)

In diesem Motiv liegen fünf konservierte Aminosäuren, die durch variable Aminosäuren voneinander getrennt sind. Die Autoren nehmen an, daß das erste Valin durch andere hydrophobe Reste ersetzbar ist. Solchen Regionen ordnet man bei der Faltung von Proteinen eine Bedeutung zu (Kamps et al., 1984). Welchen Einfluß das beschriebene Motiv für die Faltung des Fragminmoleküls hat, ist unbekannt. In der Severinsequenz ist dieses Motiv einmal vorhanden, allerdings ist das erste Valin durch Isoleucin ersetzt:

Sev 309 Ile x x Try x Gly x x x x x Glu x x x Ala

Ampe und Vandekerckhove (1987) haben die Fragminsequenz mit der Gelsolinsequenz verglichen und finden eine signifikante Homologie (36%), die sich über das ganze Molekül erstreckt. Diese strukturelle Homologie zwischen Fragmin und Gelsolin steht in Einklang mit der funktionellen Ähnlichkeit der beiden Proteine.

Severin	36	WKGVGQAPGLKIWRIFNVVPPESSYGKFDGDSYIIL...HTFKEGN	82
Fragmin	1	WKGAGKQVGVEIWRIQQFKVVPVPPKHHSSFYTGDSYIVLTTYHPKTNPD	50
Severin	83	SLKHDHFFLGTFTTQDEAGTAAYKTVELDDFLGGAPIQYRQCQSYESPS	132
Fragmin	51	KLAYDVHFWLGAFTTQDEAGTAAYKTVELDDYLGLLPVQYREYQGYESER	100
Severin	133	FLSLF.PKYFILSGGVESGFNVHKPTEYKPRLLHISGDKNAKVAEVPLAT	181
Fragmin	101	FLSLFKGGLHILDGGVETGFHHVEADKYR.....I.....RVHEVPKTY	139
Severin	182	SSLNSGDCFLLDAGLTIYQFNQSKSSPQEKNAAEVARAIDAERKGLPKV	231
Fragmin	140	KSLNSGDVFLVDAGKTVIQWNGAKAGLLEKVKAAELLQAIEGEREGIASG	189
Severin	232	EVFCETDSIPAEFWKLLGKGKAIA.....AKHETAPTKEKVLKLS	275
Fragmin	190	RVVAEADNDI..EFFTLGDKGPIADAAAGGSDLEADKKDQPAVLLRLSD	237
Severin	276	ASGSLKFSEVSRG.KINKSSLKSEDFIIDLGNEIYTWIGSKSSPNEKKT	324
Fragmin	238	ASGKFETEVARGLVKVRNLLDSNDVFVLYTGAEVFAVVGKHASVGEKKK	287
Severin	325	AFSHATQYLV..NNKRCEYTPIVRVLENTNQSFE	357
Fragmin	288	ALSFA.QEYVQKAGLPIHI.PVARILEGGENEVF	320

Abb.26: Sequenzvergleich zwischen Fragmin und Severin.

Die gesamte Severin Sequenz wurde mit der von Ampe und Vanderkerckhove (1987) veröffentlichten Fragmin (cap42(a)) Sequenz verglichen. Es wurde das Computerprogramm "Bestfit" benutzt. Identische Aminosäuren sind durch vertikale Striche gekennzeichnet.

So läßt sich das Modell der kooperativen Aktinbindung, das für die Gelsolin-Aktin-Interaktion aufgestellt wurde (Janmey et al., 1986), auf die Aktinbindung von Fragmin übertragen. Dieses Modell postuliert, daß das 1. Aktinmolekül an eine Calcium-abhängige Bindungsstelle von Gelsolin oder Fragmin bindet. Durch diese Bindung wird eine zweite Calcium-unabhängige Bindungsstelle für Aktin zugänglich. Durch Erniedrigung der Calciumkonzentration wird nur die Calcium-

abhängige Bindung gelöst, während das Dimer intakt bleibt. Ampe und Vandekerckhove (1987) konnten zeigen, daß Fragmin wie Gelsolin zwei Aktinmoleküle bindet. Die Aktinbindung von freiem Fragmin ist Calcium-abhängig und reversibel, wohingegen die Bindung des zweiten Aktinmoleküls an das Aktin-Fragmin-Dimer Calcium-unabhängig ist. Letztere kann folglich nicht durch eine Erniedrigung der Calciumkonzentration gelöst werden. Nur die freien "fragmenting proteins" sind in der Lage F-Aktin zu fragmentieren, während die Heterodimere nur eine "capping" Aktivität zeigen (Janmey et al., 1985; Ohnuma und Mabuchi, 1986). Dieses Modell wurde für Fragmin bewiesen (Hinssen, 1981).

Die bisher vorliegenden Informationen zur Struktur und Funktion der fragmentierenden Proteine weisen darauf hin, daß in dieser Protein-Familie der Mechanismus zur Fragmentierung von Aktinfilamenten während der Evolution konserviert wurde. So ist es vorstellbar, daß das Gelsolin-Gen während der Evolution durch die Duplikation eines ursprünglichen Gens, das für ein Severin-ähnliches Molekül kodierte, entstanden ist.

4.1.4. Sequenzvergleich zwischen Severin und Aktin

Der Vergleich zwischen den Sequenzen der fragmentierenden Proteine und Aktin war von besonderem Interesse. Von Maruta et al. (1984) wurde die Hypothese aufgestellt, daß die von ihnen aus *Physarum* isolierten "capping proteins" Aktinvarianten sind. Dabei stützten sich die Autoren auf die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen Fragmin und cap42(a) sowie cap42(b) und Aktin. Sie nahmen an, daß für diese Proteine vier verschiedene Gene kodieren, und daß sich diese Gene darüber hinaus aus einem gemeinsamen ursprünglichen Gen durch Duplikation und nachfolgende Mutationen während der Evolution abgeleitet haben. Folglich sollte man umfassende Sequenzhomologien zwischen Fragmin, cap42(a), cap42(b) und Aktin finden. (Ampe und Vandekerckhove (1987) konnten jedoch vor kurzem zeigen,

daß cap42(a) und Fragmin, sowie cap42(b) und Aktin identisch sind. Dadurch wurde der Hypothese der Aktinvarianten die Grundlage entzogen.) Auf Grund der funktionellen Ähnlichkeit zwischen Severin und Fragmin, bzw. Gelsolin und Fragmin wurden die Sequenzen dieser Proteine mit der Sequenz von Aktin verglichen. Keine der bisher veröffentlichten Sequenzen von fragmentierenden Proteinen zeigt eine wesentliche Homologie zum Aktin-Molekül. Die einzigen Ausnahmen sind das Tetrapeptid Asp-Glu-Ser-Gly (Gelsolin), das auch in Nicht-Muskel-Aktin und Evertetraten-Aktin vorkommt (Vandekerckhove und Weber, 1978) und das Tetrapeptid Asp-Glu-Ala-Gly (Severin, Fragmin), das in Muskel-Aktin vorkommt (Collins und Elzinga, 1975).

Beim Sequenzvergleich zwischen Gelsolin und p36, einem Vertreter einer Gruppe von Calcium-regulierten, membrangebundenen aktinbindenden Proteinen, wurde von Burgoyne (1987) nur eine Region mäßiger Homologie gefunden. Diese Homologie umfaßt sechs Aminosäuren innerhalb einer Domäne von zwanzig Aminosäuren, die von konservierten Leucinresten eingegrenzt wird, und in der sich auch das Tetrapeptid Asp-Glu-Ser-Gly befindet. Vergleicht man die Severinsequenz mit dieser Domäne, so stellt man fest, daß die p36 und Gelsolin gemeinsamen Aminosäuren auch in der Severinsequenz konserviert sind (Abb.27). Ampe und Vandekerckhove (1987) haben die Fragminsequenz ebenfalls mit dieser Region verglichen und finden die gleiche Übereinstimmung.

Da p36 Aktinfilamente nicht schneidet, sondern seine Funktion ähnlich der von Fodrin wohl darin besteht, das Zytoskelett mit der Membran zu vernetzen, nimmt der Autor an, daß diese Domäne die Aktinbindungsstelle der Moleküle darstellt.

Severin	92	L	G	T	F	T	T	Q	D	E	A	G	T	A	A	Y	K	T	V	E	L	D	D	F	L	G	G	A	P	I	121
Fragmin		L	G	A	F	T	T	Q	D	E	A	G	T	A	A	Y	K	T	V	E	L	D	D	Y	L	G	G	L	P	V	
Gelsolin	84	L	G	N	E	C	S	Q	D	E	S	G	A	A	A	I	F	T	V	Q	L	D	D	Y	L	N	G	R	A	V	117
p36	82	L	P	S	A	L	K	S	A	L	S	G	H	L	E	T	V	I	L	G	L	L	K	T	P	A	Q	Y	D	A	110
	154	L	E	K	D	I	I	S	D	T	S	G	D	F	R	K	L	M	V	A	L	A	K	G	R	R	A	E	D	G	180
	240	L	E	-	S	I	K	K	E	V	K	G	D	L	E	N	A	F	L	N	L	V	Q	C	I	Q	N	K	P	L	199
	314	L	Y	Y	I	Q	D	T	K	G	D	Y	O	K	A	L	L	Y	L	C	G	G	D								338

Abb.27: Homologie zwischen p36, Fragmin, Gelsolin und Severin (nach Burgyone, 1987).

Die homologen Aminosäuren sind eingerahmt. Es wurde die Region verglichen, die auch das Tetrapeptid DESG/DEAG enthält.

Die Bindungsstelle des die Severinaktivität blockierenden Antikörpers

MAK 102-200-1 kann gut lokalisiert werden. Sie befindet sich zwischen Aminosäure 23 und Aminosäure 63, und somit in einer Region, die starke Homologien zwischen Gelsolin, Villin, Fragmin und Severin aufweist. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, daß diese Region eine Bedeutung für die fragmentierende Aktivität dieser Proteine hat. Dabei ist zu beachten, daß auf Grund der Größe von Immunglobulinen vorstellbar ist, daß durch die Bindung des Antikörpers an Severin die benachbarte, das Tetrapeptid Asp-Glu-Ala-Gly umgebende Domäne, auch blockiert wird. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß der Antikörper auch dann blockiert, wenn er weit entfernt von der Interaktionsstelle zwischen Severin und Aktin bindet.

Noch aus einem zweiten Grund wird der Vergleich mit den Calcium-abhängigen, Membran-gebundenen Proteinen interessant: p35, p36 und p11 (Weber et al., 1987) besitzen ebenso wie Severin, Fragmin und Gelsolin keine typische "EF-hand"-Struktur (Kretsinger, 1980) oder ein vergleichbares Motiv, das für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich ist. Spektroskopische Untersuchungen an p36 und p11 zeigten einen direkten Einfluß der Ca^{2+} -Bindung auf eine Region der Proteine, in der sich ein einzelner Tryptophanrest in der Nähe eines konservierten Arginin- und Glycinrestes befindet (Weber et al., 1987). Die Autoren diskutieren

die Frage, ob dieser Tryptophanrest direkt an der Ca^{2+} -Bindung beteiligt ist.

4.2. Bei der Mutante HG1132 wurden keine zellbiologischen Defekte gefunden

Bei der Mutante HG1132 handelt es sich um eine Defektmutante, die das F-Aktin fragmentierende Protein Severin nicht exprimiert. Mit Hilfe der Mutante hoffte man, neue Hinweise auf die physiologische Rolle des Severins zu erhalten.

Severin ist ein zytoplasmatisches Protein, das nicht in der Aktinmatrix des Zellcortex lokalisiert ist (Giffard et al., 1983). Der Gehalt an Aktin im Zellcortex ist von der Calcium-Konzentration abhängig; mit steigender Calcium-Konzentration nimmt der Aktin Gehalt in der cortikalen Matrix ab. Eine von Giffard et al. (1983) aufgestellte Hypothese zur Erklärung dieser Resultate lautet, daß Ca^{2+} -abhängige akzessorische Proteine - wie zum Beispiel Severin - die Assoziation von Aktin mit der Matrix inhibieren. Die Interaktion von Severin mit Aktin scheint durch die Anwesenheit anderer aktinbindender Proteine beeinflußt zu werden. So kann die Bindung des Severins an Aktin durch das Myosin-S1-Fragment verhindert werden (Giffard et al., 1984).

In den durchgeführten zellbiologischen Tests wurde kein physiologischer Defekt sichtbar. Wie der Ausgangsstamm AX2 wachsen die HG1132-Zellen axenisch. Die Generationszeit liegt bei acht bis neun Stunden. Die durch Lichtstreuungs-Versuche gemessenen cAMP-Antworten zeigen keinen Unterschied zum Wildtyp. Motilität und Chemotaxis sind in den Grenzen der statistischen Streuung normal.

Aus diesen Ergebnissen können zwei Schlüsse gezogen werden:

- a) Severin hat für die *Dictyostellium*-Zelle unter Laborbedingungen keine essentielle Bedeutung;
- b) Die physiologische Rolle von Severin kann mit keinem der durchgeführten Tests erfaßt werden.

Dictyostellium discoideum ist ein im Boden lebender Organismus. In seinem

natürlichen Lebensraum treten unter anderem klimabedingte Veränderungen auf, so daß der Organismus auch an Extrembedingungen angepaßt sein muß. Die Tests wurden immer unter reproduzierbaren, optimalen Bedingungen durchgeführt, d.h. es wurden keine Anforderungen an die Anpassungsfähigkeit des Organismus gestellt. Wenn zum Beispiel Severin ein Protein ist, das bei der Anpassung von *Dictyostelium* an Extrembedingungen eine entscheidende Rolle spielt, so wäre man mit den durchgeführten Tests nicht in der Lage, diese Bedeutung zu erkennen.

4.3. Expression des Severin-Gens: Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante

Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse weisen darauf hin, daß nur ein Gen für Severin kodiert. Die mRNA ist etwa 1.4 kb lang. Im Laufe der *Dictyostelium*-Entwicklung nimmt der Severin-spezifische mRNA-Gehalt zu und erreicht sein Maximum mit dem Beginn der Aggregation. Die mRNA kann bis zur Fruchtkörperbildung nachgewiesen werden. Bei der Mutante HG1132 kann das Severin-Gen durch Hybridisierung detektiert werden. Für das Enzym MboII konnte beim Vergleich mit AX2 ein Restriktionspolymorphismus nachgewiesen werden.

Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse führt zu folgender Hypothese über die Art der Mutation: Im Severin-Gen des Wildtyps befindet sich mindestens eine MboII-Schnittstelle. Beim Verdau mit MboII erhält man ein 1,5 kB und ein 0,5 kB Fragment. Durch die Mutation wird im Severin-Gen der Mutante eine zusätzliche MboIISchnittstelle geschaffen, wodurch das 1,5 kB Fragment in ein 0,8 und ein 0,7 Fragment gespalten wird. Von diesen beiden Fragmenten leuchtet nach Hybridisierung mit dem nicktranslatierten 0,9 kB Fragment aus cDS1 nur die 0,8 kB Bande auf. Entweder findet zum 0,7 kB Fragment keine Hybridisierung statt, da es dem im unvollständigen cDNA-Klon fehlenden Teil des Severin-Gens entspricht, oder aber beide Subfragmente hybridisieren, ergeben aber nur eine Bande im Autoradiogramm, da sie aufgrund ihrer fast identischen Größe durch Gelelektrophorese nicht trennbar sind. Eine andere Erklärung der Ergebnisse

wäre, daß bei der Mutante das Severin-Gen bis zur hypothetischen MboII-Stelle deletiert ist. Dagegen spricht, daß die Restriktionsmuster aller anderen verwendeten Restriktionsenzyme für Wildtyp und Mutante identisch sind. Ein größerer Stückverlust sollte durch die Southern-Blot-Analyse nachweisbar sein. Außerdem werden durch Mutagenisierung mit N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin vor allem Punktmutationen hervorgerufen.

Ein weiterer Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante besteht auf der mRNA Ebene. Northern-Blot-Experimente zeigen, daß das Severin-Gen der Mutante zwar transkribiert wird, das Transkript jedoch etwa 100 bp länger ist als die mRNA des AX2-Elternstammes. Auch dieses Ergebnis spricht dagegen, daß die Mutation in einem größeren Stückverlust besteht.

Aufgrund dieser Daten wird folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

Das Severin-Gen besitzt mindestens ein Intron. Durch Mutagenisierung von AX2-Zellen mit N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin wird ein Basenaustausch in einem der Intron-flankierenden Dinukleotide (5'GT oder AG3') hervorgerufen. Dadurch wird eine der konservierten Spleiß-Stellen inaktiviert. Durch die gleiche Mutation wird eine neue MboII-Schnittstelle (GAAGAN_{9/13}) geschaffen. Beispiele dafür sind:

5'GTAGA → 5'GAAGA
5'GTAAGA → 5'GGAAGA TCTTAG3' → TCTTCG3'
5'GAAGT → 5'GAAGA

Diese Beispiele orientieren sich an den gefundenen Consensus-Sequenzen für die Spleiß-Stellen (Cech, 1983). Eine vergleichbare Situation liegt bei bestimmten Formen der Thalassämie vor. Man hat festgestellt, daß die α -Mutation, die dazu führt, daß kein β -Globin produziert wird, aus einem einzigen Basenaustausch in der Donorspleiß-Stelle des zweiten Introns besteht (Nevins, 1983).

Andere für das Spleißen wichtige Sequenzen umfassen eine ganze Basenfolge, die durch einen einzelnen Basenaustausch nicht so stark verändert werden würde, daß der gesamte Spleißvorgang nicht stattfinden könnte (Keller, 1984; Reed und Maniatis, 1985).

Das Prozessieren des primären Transkripts durch den Spleißvorgang wird als Voraussetzung für den Transport der mRNA in das Zytoplasma angesehen (Alberts et al., 1983). Demzufolge sollte bei der Mutante kein Transkript des Severin-Gens im Zytoplasma nachweisbar sein. Bei der für die Northern-Blot-Analyse verwendeten RNA handelt es sich überwiegend um zytoplasmatische RNA, doch wurden die Zellkerne bei der Präparation nicht abgetrennt. Der Befund, daß bei der Mutante bedeutend weniger Transkript detektierbar ist als beim Wildtyp, steht im Einklang mit der Spleißhypothese, die besagt, daß ungespleißte RNA wesentlich leichter degradiert wird als mRNA (Lewin, 1983).

Falls das Transkript der Mutante ungespleißt ist und deshalb den Zellkern nicht verlassen kann, erübrigen sich Diskussionen über die Translatierbarkeit des Transkripts. Falls jedoch die größere RNA der Mutante im Zytoplasma vorliegt, so wäre zu folgern, daß sie entweder nicht translatiert wird, oder daß das Produkt schnell abgebaut wird. Ein Grund für die Nichttranslatierbarkeit könnten Translations-Stoppkodons auf dem Intron sein. Ein Grund für einen schnellen Abbau des Translationsproduktes könnten Sequenzen des Introns sein, die die korrekte Proteinfaltung stören und das Produkt dadurch einer raschen Degradation zuführen.

Um eine der Hypothesen zu bestätigen, müßten zunächst die Severin-Gene von Mutante und Wildtyp sequenziert und miteinander verglichen werden. Nur auf diese Weise ist die Veränderung im Mutanten-Gen eindeutig identifizierbar. Sollte sich die aufgestellte Hypothese dabei nicht bestätigen, so wäre man mit Hilfe dieser genomischen Klone in der Lage, die dann anstehenden Promotorstudien durchzuführen. Als erster Schritt wurde eine genomische Bank von HG1132 angelegt (EMBL4) und mehrmals durchsucht. Bis jetzt ist es jedoch nicht

gelungen, einen vollständigen genomischen Klon zu isolieren.

5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Untersuchungen zur Struktur und Funktion des aus *Dictyostelium discoideum* isolierten Aktinfilamente fragmentierenden Proteins Severin.

Es wurden gegen Severin gerichtete monoklonale Antikörper und polyklonale Antisera hergestellt. Vier monoklonale anti-Severin Antikörper wurden zum Screening einer cDNA-Bank von *Dictyostelium discoideum* verwendet. Dabei wurde ein cDNA-Klon gefunden, der Teilsequenzen des Severin-Gens trägt und der zum weiteren Suchen nach einem vollständigen Klon eingesetzt wurde. Nach Sequenzierung eines 1,3 kb Fragments lag die gesamte kodierende Sequenz des Severin-Gens vor. Diese Sequenz wurde durch den Vergleich mit einer Severin-Peptidsequenz verifiziert. Die Molmasse von Severin beträgt laut Sequenz 39,9 kD. Die mRNA von etwa 1,4 kb kann während des gesamten Entwicklungszyklus von *D. discoideum* nachgewiesen werden. Southern-Blot-Analysen zeigen, daß Severin von einem einzigen Gen kodiert wird. Die von der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit den Sequenzen der funktionsverwandten aktinbindenden Proteine Gelsolin, Fragmin und Villin verglichen. Die Sequenzhomologie zwischen Severin und Fragmin ist am stärksten ausgeprägt. Beim Sequenzvergleich zwischen Gelsolin und Villin hatte man bereits in einer Region, der man die fragmentierende Aktivität zuschreibt, bemerkenswerte Homologien gefunden. Die Aminosäuresequenz von Severin zeigt ebenfalls in jener Region eine besonders stark ausgeprägte Homologie zur Gelsolinsequenz. Für die Untersuchung der physiologischen Rolle des Severinmoleküls stand eine Mutante zur Verfügung, die durch Mutagenisierung von AX2-Wildtyp-Zellen mit MNNG erzeugt worden war und die auf Grund von Tests mit einem anti-Severin Antikörper isoliert worden war. Diese Mutante wurde genauer charakterisiert: Durch Immunoblot-Analyse mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern und polyklonalen Antisera, sowie durch biochemische Charakterisierung von Mutantenzellen und

Tests auf viskositätserniedrigende Aktivität, konnte kein Severin detektiert werden. Auf molekularer Ebene wurde bei der Mutante eine zweite, durch die Mutagenisierung erzeugte Schnittstelle für das Restriktionsenzym MboII gefunden. Die mRNA der Mutante ist etwa 100 bp größer als die des Wildtyps.

Im Gegensatz zu den Unterschieden auf der DNA- und RNA-Ebene und dem Fehlen des Proteins konnte mit den durchgeführten zellbiologischen Untersuchungen bei der Severin-Mutante HG1132 kein physiologischer Defekt nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. eds.(1983):
Molecular biology of the cell. Garland publishing, NY.

Ampe, C., Vandekerckhove, J., (1987): The F-actin capping proteins of *Physarum polycephalum*: cap(42a) is very similar, if not identical, to fragmin and is structurally and functionally very homologous to gelsolin; cap(42b) is *Physarum* actin. EMBO J. 6: 4149-4157.

André, E., Lottspeich, F., Schleicher, M., Noegel, A. (1988): Severin, Gelsolin, and Villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. J. Biol. Chem. 263: 722-727.

Ashworth, J.M., Watts, D.J. (1970): Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. Biochem. J. 119: 175-182.

Bennett, V., Davies, J., Fowler, W.A. (1982): Brain spectrin, a membrane-associated protein related in structure and function to erythrocyte spectrin. Nature 299: 126-131.

Birnboim, C., Doly, J. (1979): Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.

Boehringer Mannheim (1987): Guidelines for quick and simple plasmid sequencing.

Bretscher, A. Weber, K. (1980): Villin is a major protein of microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner. Cell 20: 839-847.

Brown, S., Yamamoto, K., Spudich, J.A. (1982): A 40,000-dalton protein from *Dictyostelium discoideum* affects assembly properties of actin in a Ca^{2+} -dependent manner. J. Cell Biol. 93: 205-210.

Bryan, J., Hwo, S. (1986): Definition of a N-terminal actin-binding domain and a C-terminal Ca^{2+} regulatory domain in human brevinn. J. Cell Biol. 102: 1439-1446.

Burgoyne, R.D. (1987): Gelsolin and p36 share a similar domain. Trends Biochem. 12: 85-86.

Cech, T.R. (1983): RNA splicing: three themes with variations. *Cell* 34: 713-716.

Chaponnier, C., Janmey, P.A., Yin, H.L. (1986): The actin filament severing domain of plasma gelsolin. *J. Cell Biol.* 103: 1473-1481.

Chen, E.J., Seeburg, P.H. (1985): Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165-170.

Chou, P.Y., Fasman, G.D. (1978): Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.*, John Wiley, New York, Vol. 47: 45-148.

Claviez, M., Pagh, K., Maruta, H., Baltes, W., Fisher, P., Gerisch, G. (1982): Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of *Dictyostelium* myosi. *EMBO J.* 1: 1017-1022.

Collins, J.H., Elzinga, M. (1975): The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 250: 5915-5920.

Condeelis, J., Vahey, M. (1982): A Calcium- and pH-regulated protein from *Dictyostelium discoideum* that cross-links actin filaments. *J. Cell Biol.* 94: 466-471.

Condeelis, J., Geosits, S., Vahey, M. (1982): Isolation of a new actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil.* 2: 273-285.

Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P. (1981): A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 112: 295-298.

Fechheimer, M., Brier, J., Rockwell, E., Luna, E.J., Taylor, D.L. (1982): A Calcium- and pH-regulated actin-binding protein from *D. discoideum*. *Cell Motil.* 2: 287-308.

Fechheimer, M. (1987): The *Dictyostelium discoideum* 30,000-dalton protein is an actin filament-bundling protein that is selectively present in filopodia. *J. Cell Biol.* 104: 1539-1551.

Fontana, A., Dalzoppo, D., Grandi, C., Zamboni, M. (1983): Cleavage at tryptophan with o-iodosobenzoic acid. *Methods Enzymol.* 91: 311-318.

- Gerisch, G., Hess, B. (1974): Cyclic AMP-controlled oscillations in suspended *Dictyostelium* cells: their relation to morphogenetic cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 2118-2122.
- Gerisch, G., Keller, H.U. (1981): Chemotactic reorientation of granulocytes stimulated with micropipettes containing fMet-Leu-Phe. *J. Cell. Sci.* 52: 1-10.
- Giffard, R.G., Spudich, J.A., Spudich, A. (1983): Ca^{2+} -sensitive isolation of a cortical actin matrix from *Dictyostelium* amoebae. *J. of Muscle Research and Cell Motility* 4: 115-131.
- Giffard, R.G., Weeds, A.G., Spudich, J.A. (1984): Ca^{2+} -dependent binding of Severin to actin: a one-to-one complex is formed. *J. Cell Biol.* 98: 1796-1803.
- Glenney, J.R., Bretscher, A., Weber, K. (1980): Calcium control of the intestinal microvillins cytoskeleton: its complication for regulation of microfilament organizations. *Science* 77: 6458-6462.
- Glenney, J.R., Weber, K. (1981): Calcium control of microfilaments: uncoupling of the F actin severing and bundling activity of villin by limited proteolysis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 2810-2814.
- Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H., Hatano, S. (1980): Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor on the formation of actin filaments. *Biochemistry* 19: 2677-2683.
- Hinssen, H. (1981): An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. I. *Eur. J. Cell Biol.* 23: 225-233.
- Hinssen, H. (1981): An actin-modulating protein from *Physarum polycephalum*. II. Ca^{2+} dependence and other properties. *Eur. J. Cell Biol.* 23: 234-240.
- Hinssen, H., Small, J.V., Sobiechzek, A. (1984): A Ca^{2+} -dependent actin modulator from vertebrate smooth muscle. *FEBS Lett.* 166: 90-95.
- Hock, R.S., Condeelis, J.S. (1985): Properties of the 240 k dalton actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 101: 407a.

- Hock, R.S., Condeelis, J.S. (1987): Isolation of a 240-kilodalton actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 262: 394-400.
- Holmes, D.S., Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197.
- Janmey, P.A., Chaponnier, C., Lind, S.E., Zaner, K.S., Stossel, T.P., Yin, H.L. (1985): Interactions of gelsolin and gelsolin actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing and end blocking. Biochemistry 24: 3714-3723.
- Janmey, P.A., Stossel, T.P., Lind, S.E. (1986): Sequential binding of actin monomers to plasma gelsolin and its inhibition by vitamin D-binding protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 136: 72-79.
- Kamps, M.P., Taylor, S.S., Sefton, B.M. (1984): Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites. Nature 310: 589-592.
- Keller, W. (1984): The RNA lariat: a new ring to the splicing of mRNA precursors. Cell 39: 423-425.
- Kimmel, A. R., Firtel, R.A. (1985): Sequence organization and developmental expression of an interspersed, repetitive element and associated single-copy DNA sequences in *Dictyostelium discoideum*. Mol. Cell. Biol. 5: 2123-2130.
- Kobayashi, R., Bradley, W.A., Bryan, J., Field, J.B. (1983): Identification and purification of calcium ion dependent modulators of actin polymerization from bovine thyroid. Biochemistry 22: 2463-2469.
- Köhler, G., Milstein, C. (1976): Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-519.
- Korn, E.D., Carlier, M.-F., Pantaloni, D. (1987): Actin polymerisation and ATP hydrolysis. Science 238: 638-644.
- Krefft, M., Voet, L., Gregg, J.H., Mairhofer, H., Williams, K.L. (1984): Evidence that positional information is used to establish the prestalk-prespore pattern in *D.discoideum* aggregates. EMBO J. 3: 201-206.

- Kretsinger, R. H. (1980): Structure and evolution of calcium modulated proteins. CRC Crit. Rev. Biochem. 8: 119-174.
- Kurth, M.C., Wang, L.L., Dingus, J., Bryan, J. (1983): Purification and characterization of a gelsolin-actin complex from human platelets. J. Biol. Chem. 258: 10895-10903.
- Kwiatkowski, D.J., Janmey, P.A., Mole, J.E., Yin, H.L. (1985): Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin. J. Biol. Chem. 260: 15232-15238.
- Kwiatkowski, D.J., Stossel, T.P., Orkin, S.H., Mole, J.E., Colten, H.R., Yin, H.L. (1986): Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. Nature 323: 455-458.
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157: 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lacombe, M.-L., Podgorski, G.F., Franke, J., Kessin, R. (1986): Molecular cloning and developmental expression of the cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 261: 16811-16817.
- Lewin, B. (1983): Genes. Editor, Cell; N.Y.
- Lottspeich, F. (1985): J. Chromatogr. 326: 321-327.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, A. L., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MacLean-Fletcher, S., Pollard, T.D. (1980): Mechanism of action of cytochalasin b on actin. Cell 20: 329-341.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. eds. (1982): Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.

- Maruta, H., Knoerzer, W., Hinssen, H., Isenberg, G. (1984): Regulation of actin polymerization by non polymerizable actin-like protein. *Nature* 312: 424-427.
- Maruyama, K., Kimura, S., Ishii, T., Kuroda, M., Ohashi, K., Muramatsu, S. (1977): Beta-actinin a regulatory protein of muscle. *J. Biochem.* 81: 215-232.
- Matsudaira, P.T., Burgess, D.R. (1982): Partial reconstitution of the microvillus core bundle: characterization of villin as a Ca^{2+} -dependent actin-bundling/depolymerizing protein. *J. Cell Biol.* 92: 648-656.
- Matsudaira, P.T., Jakes, R., Cameron, L., Atherton, E. (1985): Mapping the cysteine residues and actin-binding regions of villin by using antisera to the amino and carboxy termini of the molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 6788-6792.
- Matteucci, M. D., Caruthers, M. H. (1981): Syntesis of deoxynucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185-3191.
- Mooseker, M.S., Graves, T.A., Wharton, K.A., Falco, N., Howe, C.L. (1980): Regulation of microvillins structure: calcium-dependent solation and crosslinking of actin filaments in microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 87: 809-822.
- Mornet, D., Ue, K. (1984): Proteolysis and structure of skeletal muscle actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3680-3684.
- Nevins, J.R. (1983): The pathway of eucaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 441-466.
- Noegel, A., Welker, D. L., Metz, B.A., Williams, K. L. (1985): *J. Mol. Biol.* 185: 447-450.
- Ohnuma, M., Mabuchi, I. (1986): The 45K molecular weight actin-modulating protein from sea urchin eggs forms a complex with actin in the presence of calcium ions. *J. Biochem.* 100: 817-820.
- Ohta, Y., Endo, S., Nishida, E., Murofushi, H., Sakai, H. (1984): *J. Biochem.* 96: 1547-1558.

Petrucci, T.C., Thomas, C., Bray, D. (1983): Isolation of a Ca^{2+} -dependent actin-fragmenting protein from brain, spinal cord, and cultured neurones. J. Neurochem. 40: 1507-1516.

Pollard, T.D., Cooper, J.A. (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Ann. Rev. Biochem. 55: 987-1035.

Pollard, T.D. (1986):

J.Cell. Biochem. 31: 87-94.

Raper, K.B. (1973): Acrasiomycetes. In "The Fungi: An Advanced Treatise" (G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow, A.S. Sussman, eds.), Vol. IVB, 9-36. Academic press, NY.

Reed, R., Maniatis, T. (1985): Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. Cell 41: 95-105.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237-251.

Rouayrenc, J.F., Fattoum, A., Gabrion, J., Audemard, E., Kassab, R. (1984): Muscle gelsolin: isolation from heart tissue and characterization as an integral myofibrillar protein. FEBS Lett. 167: 52-58.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467.

Sanger, J.M., Sanger, J.W. (1980): Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells. J. Cell Biol. 86: 568-575.

Schleicher, M., Gerisch, G., Isenberg, G. (1984): New actin-binding proteins from *Dictyostelium discoideum*. EMBO J. 3: 2095-2100.

Smith, D. B., Lind, S.E., Yin, H.L., Stossel, T.P. (1984): Low levels of plasma gelsolin in patients with adult respiratory distress syndrome. Clin. Res. 32: 708a.

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

- Stadler, J., Bordier, C., Lottspeich, F., Henschen, A., Gerisch, G. (1982): Improved purification and N-terminal amino acid sequence determination of the contact site A glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363: 771-776.
- Stossel, T.P., Hartwig, J.H. (1976): Interactions of actin, myosin, and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages: role in cytoplasmic movement and phagocytosis. J. Cell Biol. 68: 602-619.
- Stossel, T.P. (1984): Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. J. Cell Biol. 99: 15s-21s.
- Stossel, T.P., Chaponnier, C., Ezzell, R.M., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Kwiatkowski, D.J., Lind, S.E., Smith, D.B., Southwick, F.S., Yin, H.L., Zaner, K.S. (1985): Nonmuscle actin-binding proteins. Ann. Rev. Cell Biol. 1: 353-402.
- Taylor, D.L., Condeelis, J.S. (1979): Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. Int. Rev. Cytol. 56: 57-144.
- Tellam, R., Frieden, C. (1982): Cytochalasin D and platelet gelsolin accelerate actin polymer formation. A model for regulation of the extent of actin polymer formation in vivo. Biochemistry 21: 3207-3214.
- Thomas, P. S. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 5201-5207.
- Tilney, L.G., Hatano, S., Ishikawa, H., Mooseker, M.S. (1973): The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. J. Cell Biol. 59: 109-126.
- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350-4354.
- Vandekerckhove, J., Weber, K. (1978): Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 1106-1110.

- Wallraff, E., Schleicher, M., Modersitzki, M., Rieger, D., Isenberg, G., Gerisch, G. (1986): Selection of *Dictyostelium* mutants defective in cytoskeletal proteins: use of an antibody that binds to the ends of α -actinin rods. *EMBO J.* 5: 61-67.
- Warrick, H. M. (1987): Codon frequency in *Dictyostelium discoideum*. *Methods Cell Biol.* 28: 497-500.
- Weber, K., Johnsson, N., Plessmann, U., Van, P.N., Söling, H.-D., Ampe, C., Vande-kerckhove, J. (1987): The amino acid sequence of protein II and its phosphorylation site for protein kinase C; the domain structure Ca^{2+} -modulated lipid binding proteins. *EMBO J.* 6: 1599-1604.
- Wehland, J., Osborn, M., Weber, K. (1977): Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5613-5617.
- Yamamoto, K., Pardee, J. D., Reidler, J., Stryer, L., Spudich, J.A. (1982): Mechanisms of interaction of *Dictyostelium* severin with actin filaments. *J. Cell Biol.* 95: 711-719.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yin, H. L., Stossel, T. P. (1979): Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281: 583-586.
- Yin, H.L., Albrecht, J., Fattoum, A. (1981): Identification of gelsolin, a Ca^{2+} -dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation. Its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *J. Cell Biol.* 91: 901-906.
- Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E., Cole, F.S. (1984): Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. *J. Biol. Chem.* 259: 5271-5276.
- Young, R. A., Davies, R.W. (1983): Yeast RNA polymerase genes: isolation with antibody probes. *Science* 222: 778-782.

LEBENS LAUF

13.12.1957	geboren in Mayen, als Tochter von Stefan und Margret André, geb. Augel
1964-1967	Besuch der Volksschule in Weibern/Eifel
1967-1976	Besuch des Staatl. Neusprachl. Gymna- siums in Mayen
19.06.1976	Abitur
WS1976 - SS1979	Studium der Biologie an der Universität Bonn
1978	Vordiplom in Biologie
WS1979 - SS1984	Studium der Biologie an der Technischen Hochschule in Aachen
1983	Diplom in Biologie Diplomarbeit an der KFA in Jülich über "Untersuchungen am Ventralnervphotorezeptor von <i>Limulus polyphemus</i> mit der Sucrose- Vaseline-Spalt-Methode" unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Stieve
1984 - 1987	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Gerisch

